

## 【外国語明細書】

**1. Title of Invention**

AMPLIFICATION AND DETECTION OF *CAMPYLOBACTER*  
*JEJUNI* AND *CAMPYLOBACTER COLI*

**2. Claims**

1. An oligonucleotide consisting of a target binding sequence selected from the group consisting of the target binding sequences of AL46 (SEQ ID NO:1), AL44 (SEQ ID NO:2), AL42 (SEQ ID NO:3), of AR48 (SEQ ID NO:4), AR44 (SEQ ID NO:5) and AR42 (SEQ ID NO:6), and optionally, a sequence required for an amplification reaction.
2. The oligonucleotide of claim 1 wherein the sequence required for the amplification reaction is a restriction endonuclease recognition site that is nicked by a restriction endonuclease during Strand Displacement Amplification.
3. An oligonucleotide consisting of BL42 (SEQ ID NO:7) or BR42 (SEQ ID NO:8).
4. An oligonucleotide selected from the group consisting of DL52 (SEQ ID NO:9), a nucleic acid complementary to SEQ ID NO:9, DR48 (SEQ ID NO:10) and a nucleic acid complementary to SEQ ID NO:10
5. A kit comprising:
  - a) one or more primers selected from the group consisting of AL46 (SEQ ID NO:1), AL44 (SEQ ID NO:2) and AL42 (SEQ ID NO:3),
  - b) one or more primers selected from the group consisting of AR48 (SEQ ID NO:4), AR44 (SEQ ID NO:5) and AR42 (SEQ ID NO:6),
  - c) bumpers BL42 (SEQ ID NO:7) and BR42 (SEQ ID NO:8), and
  - d) one or more detectors selected from the group consisting of DL52 (SEQ ID NO:9), a nucleic acid complementary to SEQ ID NO:9, DR48 (SEQ ID NO:10) and a nucleic acid complementary to SEQ ID NO:10.
6. A method for detecting the presence or absence of *Campylobacter jejuni* or *C. coli* in a sample, said method comprising the steps of:
  - a) treating said sample using a pair of nucleic acid primers in a nucleic acid amplification reaction wherein a first primer is selected from the group consisting of AL46 (SEQ ID NO:1), AL44 (SEQ ID NO:2) and AL42 (SEQ ID NO:3) and a second primer is selected from the group consisting of AR48 (SEQ ID NO:4), AR44 (SEQ ID NO:5) and AR42 (SEQ ID NO:6), and
  - b) detecting any amplified nucleic acid product,wherein detection of amplified product indicates presence of *C. jejuni* and *C. coli*.

7. The method of claim 6 wherein detecting said amplified nucleic acid product is conducted by hybridizing said amplified nucleic acid product with a detector selected from the group consisting of DL52 (SEQ ID NO:9), a nucleic acid complementary to SEQ ID NO:9, DR48 (SEQ ID NO:10) and a nucleic acid complementary to SEQ ID NO:10.
8. The method of claim 6 wherein the amplification reaction, the detection or both the amplification reaction and the detection utilizes an electronic microarray.
9. A method for amplifying a target nucleic acid sequence of the *C. jejuni* and *C. coli* *sodB* gene comprising:
  - a) hybridizing to the nucleic acid
    - i) a first amplification primer consisting of a target binding sequence selected from the group consisting of the target binding sequences of AL46 (SEQ ID NO:1), AL44 (SEQ ID NO:2) and AL42 (SEQ ID NO:3), and, optionally, a sequence required for an amplification reaction, and
    - ii) a second amplification primer consisting of a target binding sequence selected from the group consisting of the target binding sequences of AR48 (SEQ ID NO:4), AR44 (SEQ ID NO:5) and AR42 (SEQ ID NO:6), and, optionally, a sequence required for the amplification reaction, and;
  - b) extending the hybridized first and second amplification primers on the target nucleic acid sequence whereby the target nucleic acid sequence is amplified.
10. The method of claim 9 further comprising detecting the amplified target nucleic acid by hybridization to a detector probe.
11. The method of claim 10 wherein the detector probe consists of DL52 (SEQ ID NO:9) or DR48 (SEQ ID NO:10) tagged with a detectable label.
12. The method of claim 10 wherein the amplification reaction, the detection or both the amplification reaction and the detection utilizes an electronic microarray.

### 3. Detailed Explanation of the Invention

5

#### FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to methods for determining the presence or absence of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in patients. The method involves using nucleic acid primers to amplify specifically the *C. jejuni* and *C. coli* superoxide dismutase (*sodB*) gene, preferably using one of the techniques of Strand Displacement Amplification (SDA), thermophilic Strand Displacement Amplification (tSDA) or fluorescent real time thermophilic Strand Displacement Amplification, and optionally using a microelectronic array.

#### BACKGROUND OF THE INVENTION

*C. jejuni* and *C. coli* are recognized as important causes of acute diarrheal disease in humans throughout the world. Nucleic acid amplification is a powerful technology that allows rapid detection of specific target sequences. It is therefore a promising technology which allows rapid detection and identification of *C. jejuni* and *C. coli*. The oligonucleotide primers of the present invention are applicable to nucleic acid amplification and detection of the *C. jejuni*- and *C. coli*-specific regions of the superoxide dismutase (*sodB*) gene. The *sodB* gene is approximately 900 base pairs in size and is important in the survival of *C. jejuni* and *C. coli* in air and during infection.

The following terms are defined herein as follows:

An amplification primer is a primer for amplification of a target sequence by extension of the primer after hybridization to the target sequence. Amplification primers are typically about 10-75 nucleotides in length, preferably about 15-50 nucleotides in length. The total length of an amplification primer for SDA is typically about 25-50 nucleotides. The 3' end of an SDA amplification primer (the target binding sequence) hybridizes at the 3' end of the target sequence. The target binding sequence is about 10-25 nucleotides in length and confers hybridization specificity on the amplification primer. The SDA amplification primer further comprises a recognition site for a restriction endonuclease 5' to the target binding sequence. The recognition site is for a restriction endonuclease which will nick one strand of a DNA duplex when the recognition site is hemimodified, as described by G. Walker, et al. (1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:392-396 and 1992 *Nucl. Acids Res.* 20:1691-1696). The nucleotides 5' to the restriction endonuclease recognition site (the "tail") function as a polymerase repriming site when the

remainder of the amplification primer is nicked and displaced during SDA. The repriming function of the tail nucleotides sustains the SDA reaction and allows synthesis of multiple amplicons from a single target molecule. The tail is typically about 10-25 nucleotides in length. Its length and sequence are generally not critical and can be routinely selected and modified. As  
5 the target binding sequence is the portion of a primer which determines its target-specificity, for amplification methods which do not require specialized sequences at the ends of the target the amplification primer generally consists essentially of only the target binding sequence. For example, amplification of a target sequence according to the invention using the Polymerase Chain Reaction (PCR) will employ amplification primers consisting of the target binding  
10 sequences of the amplification primers described herein. For amplification methods that require specialized sequences appended to the target other than the nickable restriction endonuclease recognition site and the tail of SDA (e.g., an RNA polymerase promoter for Self-Sustained Sequence Replication (3SR), Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA) or the Transcription-Based Amplification System (TAS)), the required specialized sequence may be  
15 linked to the target binding sequence using routine methods for preparation of oligonucleotides without altering the hybridization specificity of the primer.

A bumper primer or external primer is a primer used to displace primer extension products in isothermal amplification reactions. The bumper primer anneals to a target sequence upstream of the amplification primer such that extension of the bumper primer displaces the  
20 downstream amplification primer and its extension product.

The terms target or target sequence refer to nucleic acid sequences to be amplified. These include the original nucleic acid sequence to be amplified, the complementary second strand of the original nucleic acid sequence to be amplified and either strand of a copy of the original sequence which is produced by the amplification reaction. These copies serve as amplifiable  
25 targets by virtue of the fact that they contain copies of the sequence to which the amplification primers hybridize.

Copies of the target sequence which are generated during the amplification reaction are referred to as amplification products, amplimers or amplicons.

The term extension product refers to the copy of a target sequence produced by  
30 hybridization of a primer and extension of the primer by polymerase using the target sequence as a template.

The term species-specific refers to detection, amplification or oligonucleotide hybridization to a species of organism or a group of related species without substantial detection, amplification or oligonucleotide hybridization in other species of the same genus or species of a  
35 different genus.

The term assay probe refers to any oligonucleotide used to facilitate detection or identification of a nucleic acid. Detector probes, detector primers, capture probes, signal primers and reporter probes as described below are examples of assay probes.

5 The term amplicon refers to the product of the amplification reaction generated through the extension of either or both of a pair of amplification primers. An amplicon may contain exponentially amplified nucleic acids if both primers utilized hybridize to a target sequence. Alternatively, amplicons may be generated by linear amplification if one of the primers utilized does not hybridize to the target sequence. Thus, this term is used generically herein and does not imply the presence of exponentially amplified nucleic acids.

10 A microelectronic array (or electronic microarray) is a device with an array of electronically self-addressable microscopic locations. Each microscopic location contains an underlying working direct current (DC) micro-electrode supported by a substrate. The surface of each micro location has a permeation layer for the free transport of small counter-ions, and an attachment layer for the covalent coupling of specific binding entities.

15 An array or matrix is an arrangement of locations on the device. The locations can be arranged in two dimensional arrays, three dimensional arrays, or other matrix formats. The number of locations can range from several to at least hundreds of thousands.

Electronic addressing (or targeting) is the placement of charged molecules at specific test sites. Since DNA has a strong negative charge, it can be electronically moved to an area of positive charge. A test site or a row of test sites on the microchip is electronically activated with a positive charge. A solution of DNA probes is introduced onto the microchip. The negatively charged probes rapidly move to the positively charged sites, where they concentrate and are chemically bound to that site. The microchip is then washed and another solution of distinct DNA probes can be added. Site by site, row by row, an array of specifically bound DNA probes  
25 can be assembled or addressed on the microchip. With the ability to electronically address capture probes to specific sites, the system allows the production of custom arrays through the placement of specific capture probes on a microchip. In this connection, the term "electronically addressable" refers to a capacity of a microchip to direct materials such as nucleic acids and enzymes and other amplification components from one position to another on the microchip by  
30 electronic biasing of the capture sites of the chip. "Electronic biasing" is intended to mean that the electronic charge at a capture site or another position on the microchip may be manipulated between a net positive and a net negative charge so that molecules in solution and in contact with the microchip may be directed toward or away from one position on the microchip or from one position to another.

Electronic concentration and hybridization uses electronics to move and concentrate target molecules to one or more test sites (or capture sites) on the microchip. The electronic concentration of sample DNA at each test site promotes rapid hybridization of sample DNA with complementary capture probes. In contrast to the passive hybridization process, the electronic concentration process has the distinct advantage of significantly accelerating the rate of hybridization. To remove any unbound or nonspecifically bound DNA from each site, the polarity or charge of the site is reversed to negative, thereby forcing any unbound or nonspecifically bound DNA back into solution away from the capture probes. In addition, since the test molecules are electronically concentrated over the test site, a lower concentration of target DNA molecules is required, thus reducing the time and labor otherwise required for pre-test sample preparation. The term "capture site" refers to a specific position on an electronically addressable microchip wherein electronic biasing is initiated and where molecules such as nucleic acid probes and target molecules are attracted or addressed by such biasing.

Electronic stringency control is the reversal of electrical potential to remove unbound and nonspecifically bound DNA quickly and easily as part of the hybridization process. Electronic stringency provides quality control for the hybridization process and ensures that any bound pairs of DNA are truly complementary. The precision, control, and accuracy of platform technology, through the use of the controlled delivery of current in the electronic stringency process, permits the detection of single point mutations, single base pair mismatches, or other genetic mutations, which may have significant implications in a number of diagnostic and research applications. Electronic stringency is achieved without the cumbersome processing and handling otherwise required to achieve the same results through conventional methods. In contrast to passive arrays, this technology can accommodate both short and long single-stranded fragments of DNA. The use of longer probes increases the certainty that the DNA which hybridizes with the capture probe is the correct target. Electronic stringency control reduces the required number of probes and therefore test sites on the microchip, relative to conventional DNA arrays. In contrast, traditional passive hybridization processes are difficult to control and require more replicates of every possible base pair match so that correct matches can be positively identified.

Electronic multiplexing allows the simultaneous analysis of multiple tests from a single sample. Electronic multiplexing is facilitated by the ability to control individual test sites independently (for addressing of capture probes or capture molecules and concentration of test sample molecules) which allows for the simultaneous use of biochemically unrelated molecules on the same microchip. Sites on a conventional DNA array cannot be individually controlled, and therefore the same process steps must be performed on the entire array. The use of

electronics in this technology provides increased versatility and flexibility over such conventional methods.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

5 The present invention provides oligonucleotide primers that can be used for amplification of the *sodB* target sequences found in *C. jejuni* and *C. coli*. More specifically, the target sequence comprises segments of the *sodB* gene. The amplification primers have been designed for high-efficiency, high-specificity amplification at increased temperatures, such as in thermophilic SDA and the PCR, however, they are also useful in lower-temperature  
10 amplification reactions such as conventional SDA, 3SR or NASBA. Oligonucleotide assay probes that hybridize to the assay region of the amplified target are used to detect the amplification products.

The oligonucleotides of the invention may be used after culture as a means for confirming the identity of the cultured organism. Alternatively, they may be used with clinical samples from  
15 humans or animals, such as fecal material, or with samples of contaminated food or water for detection and identification of *C. jejuni* and *C. coli* *sodB* nucleic acid using known amplification methods. In either case, the inventive oligonucleotides and assay methods provide a means for rapidly discriminating between *C. jejuni* or *C. coli* and other microorganisms, allowing the practitioner to identify this microorganism rapidly without resorting to the more traditional  
20 procedures customarily relied upon. Such rapid identification of the specific etiological agent involved in an infection provides information that can be used to determine appropriate therapy within a short period of time.

#### SUMMARY OF THE SEQUENCES

25 SEQ ID NOs:1-3 are sequences of oligonucleotides used as upstream primers for amplification of the *C. jejuni* and *C. coli* *sodB* gene. SEQ ID NOs:4-6 are sequences of oligonucleotides used as downstream primers for amplification of the *C. jejuni* and *C. coli* *sodB* gene. SEQ ID NO:7 is the sequence of an oligonucleotide used as an upstream bumper for SDA amplification. SEQ ID NO:8 is the sequence of an oligonucleotide used as a downstream  
30 bumper for SDA amplification. SEQ ID NOs:9-10 are sequences of detector oligonucleotides (probes or reporters) for the *C. jejuni* and *C. coli* *sodB* gene.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention relates to oligonucleotides, amplification primers and assay probes  
35 which exhibit *Campylobacter jejuni*- and *C. coli*-specificity in nucleic acid amplification

reactions. Also provided are methods for detecting and identifying *C. jejuni* and *C. coli* *sodB* nucleic acids using the oligonucleotides of the invention. The preferred methods are to use SDA, tSDA or homogeneous real time fluorescent tSDA. These methods are known to those skilled in the art from references such as U.S. Patent No. 5,547,861, U.S. Patent No. 5,648,211, U.S. Patent No. 5,846,726 and U.S. Patent Application Serial No. 08/865,675, filed May 30, 1997, the disclosures of which are hereby specifically incorporated herein by reference. The use of microelectronic arrays for the analysis of nucleic acids are known to those skilled in the art from references such as U.S. Patent No. 5,605,662 and U.S. Patent No. 5,632,957 and PCT published application Nos. WO 96/01836 and WO 97/12030.

10       The primers of the present invention were designed based on the genomic *sodB* sequences available from GenBank. The sequences for *C. jejuni*, *C. coli*, *Helicobacter pylori* and *Escherichia coli* were compared. These sequences were edited and aligned with GeneWorks software to determine sequence homology. From the DNA alignment studies a 600-base pair region was identified with 89% homology between *C. jejuni* and *C. coli*. Primers developed for  
15       use in SDA are shown in Table 1. Also shown are probes for the detection of the resultant amplicons. The exemplary restriction endonuclease recognition sites (*Bso*BI) in the amplification primers are shown in boldface type and the target binding sequences are italicized. The target binding sequence of an amplification primer determines its target specificity.



TABLE 1  
Amplification Oligonucleotides

	Upstream Primers	
5	AL46: 5'-	CGATTCCGCTCC AGACTTCTCGGGCAGGATGGTTTGGTT (SEQ ID NO:1)
	AL44: 5'-	CGATTCCGCTCCAGACTTCTCGGGCAGGATGGTTTGGT (SEQ ID NO:2)
	AL42: 5'-	CGATTCCGCTCCAGACTTCTCGGGCAGGATGGTTTGG (SEQ ID NO:3)
	Downstream Primers	
10	AR48: 5'-	ACCGCATCGAATGCATGTCTCGGGGAAGTACCTACAAATTCT (SEQ ID NO:4)
	AR42: 5'-	ACCGCATCGAATGCATGTCTCGGGGAAGTACCTACAAATTCT (SEQ ID NO:5)
	AR42: 5'-	ACCGCATCGAATGCATGTCTCGGGAGTACCTACAAATTCT (SEQ ID NO:6)
	Upstream Bumper	
15	BL42: 5'-	ACAGGAGTTTTTGGTT (SEQ ID NO:7)
	Downstream Bumper	
	BR42: 5'-	AATAGGTGTAGCTGC (SEQ ID NO:8)
	Detector Probes	
20	DL52: 5'-	GTTAGTTTATAATACT (SEQ ID NO:9)
	DR48: 5'-	CTAGTTTTTGATTTTAGT (SEQ ID NO:10)

As nucleic acids do not require complete complementarity in order to hybridize, it is to be understood that the probe and primer sequences herein disclosed may be modified to some extent without loss of utility as *C. jejuni*- and *C. coli*-specific probes and primers. As is known in the art, hybridization of complementary and partially complementary nucleic acid sequences may be obtained by adjustment of the hybridization conditions to increase or decrease stringency (i.e., adjustment of pH, hybridization temperature or salt content of the buffer). Such minor modifications of the disclosed sequences and any necessary adjustments of hybridization conditions to maintain *C. jejuni*- and *C. coli*-specificity require only routine experimentation and are within the ordinary skill in the art.

The amplification products generated using the primers disclosed herein may be detected by a characteristic size, for example, on polyacrylamide or agarose gels stained with ethidium bromide. Alternatively, amplified target sequences may be detected by means of an assay probe, which is an oligonucleotide tagged with a detectable label. In one embodiment, at least one tagged assay probe may be used for detection of amplified target sequences by hybridization (a detector probe), by hybridization and extension as described by Walker, et al. (1992, *Nucl. Acids Res.* 20:1691-1696) (a detector primer) or by hybridization, extension and conversion to double stranded form as described in EP 0 678 582 (a signal primer). SEQ ID 9 and SEQ ID 10 are

particularly useful as detector primers, i.e., primer extension detector probes, in conjunction with the amplification primers of the invention for detection of *C. jejuni* and *C. coli*. Preferably, the assay probe is selected to hybridize to a sequence in the target that is between the amplification primers, i.e., it should be an internal assay probe. Alternatively, an amplification primer or the target binding sequence thereof may be used as the assay probe.

5 The detectable label of the assay probe is a moiety which can be detected either directly or indirectly as an indication of the presence of the target nucleic acid. For direct detection of the label, assay probes may be tagged with a radioisotope and detected by autoradiography or tagged with a fluorescent moiety and detected by fluorescence as is known in the art. Alternatively, the assay probes may be indirectly detected by tagging with a label that requires additional reagents to render it detectable. Indirectly detectable labels include, for example, chemiluminescent agents, enzymes which produce visible reaction products and ligands (e.g., haptens, antibodies or antigens) which may be detected by binding to labeled specific binding partners (e.g., antibodies or antigens/haptens). Ligands are also useful for immobilizing the ligand-labeled oligonucleotide (the capture probe) on a solid phase to facilitate its detection. Particularly useful labels include biotin (detectable by binding to labeled avidin or streptavidin) and enzymes such as horseradish peroxidase or alkaline phosphatase (detectable by addition of enzyme substrates to produce colored reaction products). Methods for adding such labels to, or including such labels in, oligonucleotides are well known in the art and any of these methods are suitable for use in the present invention.

20 Examples of specific detection methods which may be employed include a chemiluminescent method in which amplified products are detected using a biotinylated capture probe and an enzyme-conjugated detector probe as described in U.S. Patent No. 5,470,723. After hybridization of these two assay probes to different sites in the assay region of the target sequence (between the binding sites of the two amplification primers), the complex is captured on a streptavidin-coated microtiter plate by means of the capture probe, and the chemiluminescent signal is developed and read in a luminometer. As another alternative for detection of amplification products, a signal primer as described in EP 0 678 582 may be included in the SDA reaction. In this embodiment, labeled secondary amplification products are generated during SDA in a target amplification-dependent manner and may be detected as an indication of target amplification by means of the associated label.

35 For commercial convenience, amplification primers for specific detection and identification of nucleic acids may be packaged in the form of a kit. Typically, such a kit contains at least one pair of amplification primers. Reagents for performing a nucleic acid amplification reaction may also be included with the target-specific amplification primers, for

example, buffers, additional primers, nucleotide triphosphates, enzymes, etc. The components of the kit are packaged together in a common container, optionally including instructions for performing a specific embodiment of the inventive methods. Other optional components may also be included in the kit, e.g., an oligonucleotide tagged with a label suitable for use as an assay probe, and/or reagents or means for detecting the label.

The target binding sequences of the amplification primers confer species hybridization specificity on the oligonucleotides and therefore provide species specificity to the amplification reaction. Thus, the target binding sequences of the amplification primers of the invention are also useful in other nucleic acid amplification protocols such as the PCR, conventional SDA (a reaction scheme which is essentially the same as that of thermophilic SDA but conducted at lower temperatures using mesophilic enzymes), 3SR, NASBA and TAS. Specifically, any amplification protocol which utilizes cyclic, specific hybridization of primers to the target sequence, extension of the primers using the target sequence as a template and separation or displacement of the extension products from the target sequence may employ the target binding sequences of the invention. For amplification methods that do not require specialized, non-target binding sequences (e.g., PCR), the amplification primers may consist only of the target binding sequences of the amplification primers listed in Table 1.

Other sequences, as required for performance of a selected amplification reaction, may optionally be added to the target binding sequences disclosed herein without altering the species specificity of the oligonucleotide. By way of example, the specific amplification primers may contain a recognition site for the restriction endonuclease *BsoBI* that is nicked during the SDA reaction. It will be apparent to one skilled in the art that other nickable restriction endonuclease recognition sites may be substituted for the *BsoBI* recognition site including, but not limited to, those recognition sites disclosed in EP 0 684 315. Preferably, the recognition site is for a thermophilic restriction endonuclease so that the amplification reaction may be performed under the conditions of thermophilic SDA (tSDA). Similarly, the tail sequence of the amplification primer (5' to the restriction endonuclease recognition site) is generally not critical, although the restriction site used for SDA and sequences which will hybridize either to their own target binding sequence or to the other primers should be avoided. Some amplification primers for SDA therefore consist of 3' target binding sequences, a nickable restriction endonuclease recognition site 5' to the target binding sequence and a tail sequence about 10-25 nucleotides in length 5' to the restriction endonuclease recognition site. The nickable restriction endonuclease recognition site and the tail sequence are sequences required for the SDA reaction. For other amplification reactions (e.g., 3SR, NASBA and TAS), the amplification primers may consist of the target binding sequence and additional sequences required for the selected amplification

reaction (e.g., sequences required for SDA as described above or a promoter recognized by RNA polymerase for 3SR). Adaptation of the target binding sequences of the invention to amplification methods other than SDA employs routine methods for preparation of amplification primers, such as chemical synthesis, and the well known structural requirements for the primers of the selected amplification reaction. The target binding sequences of the invention may therefore be readily adapted to *C. jejuni*- and *C. coli*-specific target amplification and detection in a variety of amplification reactions using only routine methods for production, screening and optimization.

In SDA, the bumper primers are not essential for species specificity, as they function to displace the downstream, species-specific amplification primers. It is required only that the bumper primers hybridize to the target upstream from the amplification primers so that when they are extended they will displace the amplification primer and its extension product. The particular sequence of the bumper primer is therefore generally not critical, and may be derived from any upstream target sequence which is sufficiently close to the binding site of the amplification primer to allow displacement of the amplification primer extension product upon extension of the bumper primer. Occasional mismatches with the target in the bumper primer sequence or some cross-hybridization with non-target sequences do not generally negatively affect amplification efficiency as long as the bumper primer remains capable of hybridizing to the specific target sequence.

Amplification reactions employing the primers of the invention may incorporate thymine as taught by Walker, et al. (1992, *Nucl. Acids Res.* 20:1691-1696), or they may wholly or partially substitute 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate for TTP in the reaction to reduce cross-contamination of subsequent amplification reactions, e.g., as taught in EP 0 624 643. dU (uridine) is incorporated into amplification products and can be excised by treatment with uracil DNA glycosylase (UDG). These abasic sites render the amplification product unamplifiable in subsequent amplification reactions. UDG may be inactivated by uracil DNA glycosylase inhibitor (UGI) prior to performing the subsequent amplification to prevent excision of dU in newly-formed amplification products.

Strand Displacement Amplification (SDA) is an isothermal method of nucleic acid amplification in which extension of primers, nicking of a hemimodified restriction endonuclease recognition/cleavage site, displacement of single stranded extension products, annealing of primers to the extension products (or the original target sequence) and subsequent extension of the primers occurs concurrently in the reaction mix. This is in contrast to polymerase chain reaction (PCR), in which the steps of the reaction occur in discrete phases or cycles as a result of the temperature cycling characteristics of the reaction. SDA is based upon 1) the ability of a

- restriction endonuclease to nick the unmodified strand of a hemiphosphorothioate form of its double stranded recognition/cleavage site and 2) the ability of certain polymerases to initiate replication at the nick and displace the downstream non-template strand. After an initial incubation at increased temperature (about 95°C) to denature double stranded target sequences
- 5 for annealing of the primers, subsequent polymerization and displacement of newly synthesized strands takes place at a constant temperature. Production of each new copy of the target sequence consists of five steps: 1) binding of amplification primers to an original target sequence or a displaced single-stranded extension product previously polymerized, 2) extension of the primers by a 5'-3' exonuclease deficient polymerase incorporating an  $\alpha$ -thio deoxynucleoside triphosphate ( $\alpha$ -thio dNTP), 3) nicking of a hemimodified double stranded
- 10 restriction site, 4) dissociation of the restriction enzyme from the nick site, and 5) extension from the 3' end of the nick by the 5'-3' exonuclease deficient polymerase with displacement of the downstream newly synthesized strand. Nicking, polymerization and displacement occur concurrently and continuously at a constant temperature because extension from the nick
- 15 regenerates another nickable restriction site. When a pair of amplification primers is used, each of which hybridizes to one of the two strands of a double stranded target sequence, amplification is exponential. This is because the sense and antisense strands serve as templates for the opposite primer in subsequent rounds of amplification. When a single amplification primer is used, amplification is linear because only one strand serves as a template for primer extension.
- 20 Examples of restriction endonucleases which nick their double stranded recognition/cleavage sites when an  $\alpha$ -thio dNTP is incorporated are *HincII*, *HindII*, *AvaI*, *NciI* and *Fnu4HI*. All of these restriction endonucleases and others which display the required nicking activity are suitable for use in conventional SDA. However, they are relatively thermolabile and lose activity above about 40°C.
- 25 Targets for amplification by SDA may be prepared by fragmenting larger nucleic acids by restriction with an endonuclease which does not cut the target sequence. However, it is generally preferred that target nucleic acids having selected restriction endonuclease recognition/cleavage sites for nicking in the SDA reaction be generated as described by Walker, et al. (1992, *Nucl. Acids Res.* 20:1691-1696) and in U.S. Patent No. 5,270,184 (herein incorporated by reference).
- 30 Briefly, if the target sequence is double stranded, four primers are hybridized to it. Two of the primers ( $S_1$  and  $S_2$ ) are SDA amplification primers and two ( $B_1$  and  $B_2$ ) are external or bumper primers.  $S_1$  and  $S_2$  bind to opposite strands of double stranded nucleic acids flanking the target sequence.  $B_1$  and  $B_2$  bind to the target sequence 5' (i.e., upstream) of  $S_1$  and  $S_2$ , respectively. The exonuclease deficient polymerase is then used to simultaneously extend all four primers in
- 35 the presence of three deoxynucleoside triphosphates and at least one modified deoxynucleoside

triphosphate (e.g., 2'-deoxyadenosine 5'-O-(1-thiotriphosphate), "dATP $\alpha$ S"). The extension products of S<sub>1</sub> and S<sub>2</sub> are thereby displaced from the original target sequence template by extension of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. The displaced, single stranded extension products of the amplification primers serve as targets for binding of the opposite amplification and bumper primer (e.g., the extension product of S<sub>1</sub> binds S<sub>2</sub> and B<sub>2</sub>). The next cycle of extension and displacement results in two double stranded nucleic acid fragments with hemimodified restriction endonuclease recognition/cleavage sites at each end. These are suitable substrates for amplification by SDA. As in SDA, the individual steps of the target generation reaction occur concurrently and continuously, generating target sequences with the recognition/cleavage sequences at the ends required for nicking by the restriction enzyme in SDA. As all of the components of the SDA reaction are already present in the target generation reaction, target sequences generated automatically and continuously enter the SDA cycle and are amplified.

To prevent cross-contamination of one SDA reaction by the amplification products of another, dUTP may be incorporated into SDA-amplified DNA in place of dTTP without inhibition of the amplification reaction. The uracil-modified nucleic acids may then be specifically recognized and inactivated by treatment with uracil DNA glycosylase (UDG). Therefore, if dUTP is incorporated into SDA-amplified DNA in a prior reaction, any subsequent SDA reactions can be treated with UDG prior to amplification of double stranded targets, and any dU containing DNA from previously amplified reactions will be rendered unamplifiable. The target DNA to be amplified in the subsequent reaction does not contain dU and will not be affected by the UDG treatment. UDG may then be inhibited by treatment with UGI prior to amplification of the target. Alternatively, UDG may be heat-inactivated. In thermophilic SDA, the higher temperature of the reaction itself ( $\geq 50^{\circ}\text{C}$ ) can be used concurrently to inactivate UDG and amplify the target.

SDA requires a polymerase which lacks 5'-3' exonuclease activity, initiates polymerization at a single stranded nick in double stranded nucleic acids, and displaces the strand downstream of the nick while generating a new complementary strand using the unnicked strand as a template. The polymerase must extend by adding nucleotides to a free 3'-OH. To optimize the SDA reaction, it is also desirable that the polymerase be highly processive to maximize the length of target sequence which can be amplified. Highly processive polymerases are capable of polymerizing new strands of significant length before dissociating and terminating synthesis of the extension product. Displacement activity is essential to the amplification reaction, as it makes the target available for synthesis of additional copies and generates the single stranded extension product to which a second amplification primer may hybridize in exponential amplification reactions. Nicking activity of the restriction enzyme is also of great

importance, as it is nicking which perpetuates the reaction and allows subsequent rounds of target amplification to initiate.

Thermophilic SDA is performed essentially as the conventional SDA described by Walker, et al. (1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:392-396 and 1992, *Nucl. Acids Res.* 20:1691-1696), with substitution of the desired thermostable polymerase and thermostable restriction endonuclease. Of course, the temperature of the reaction will be adjusted to the higher temperature suitable for the substituted enzymes and the *HincII* restriction endonuclease recognition/cleavage site will be replaced by the appropriate restriction endonuclease recognition/cleavage site for the selected thermostable endonuclease. Also in contrast to Walker, et al., the practitioner may include the enzymes in the reaction mixture prior to the initial denaturation step if they are sufficiently stable at the denaturation temperature. Preferred restriction endonucleases for use in thermophilic SDA are *BsrI*, *BstNI*, *BsmAI*, *BstI* and *BsoBI* (New England BioLabs), and *BstOI* (Promega). The preferred thermophilic polymerases are *Bca* (Panvera) and *Bst* (New England Biolabs).

Homogeneous real time fluorescent tSDA is a modification of tSDA. It employs detector oligonucleotides to produce reduced fluorescence quenching in a target-dependent manner. The detector oligonucleotides contain a donor/acceptor dye pair linked such that fluorescence quenching occurs in the absence of target. Unfolding or linearization of an intramolecularly base-paired secondary structure in the detector oligonucleotide in the presence of the target increases the distance between the dyes and reduces fluorescence quenching. Unfolding of the base-paired secondary structure typically involves intermolecular base-pairing between the sequence of the secondary structure and a complementary strand such that the secondary structure is at least partially disrupted. It may be fully linearized in the presence of a complementary strand of sufficient length. In a preferred embodiment, a restriction endonuclease recognition site (RERS) is present between the two dyes such that intermolecular base-pairing between the secondary structure and a complementary strand also renders the RERS double-stranded and cleavable or nickable by a restriction endonuclease. Cleavage or nicking by the restriction endonuclease separates the donor and acceptor dyes onto separate nucleic acid fragments, further contributing to decreased quenching. In either embodiment, an associated change in a fluorescence parameter (e.g., an increase in donor fluorescence intensity, a decrease in acceptor fluorescence intensity or a ratio of fluorescence before and after unfolding) is monitored as an indication of the presence of the target sequence. Monitoring a change in donor fluorescence intensity is preferred, as this change is typically larger than the change in acceptor fluorescence intensity. Other fluorescence parameters such as a change in fluorescence lifetime may also be monitored.

A detector oligonucleotide for homogeneous real time fluorescent tSDA is an oligonucleotide which comprises a single-stranded 5' or 3' section which hybridizes to the target sequence (the target binding sequence) and an intramolecularly base-paired secondary structure adjacent to the target binding sequence. The detector oligonucleotides of the invention further  
5 comprise a donor/acceptor dye pair linked to the detector oligonucleotide such that donor fluorescence is quenched when the secondary structure is intramolecularly base-paired and unfolding or linearization of the secondary structure results in a decrease in fluorescence quenching. Cleavage of an oligonucleotide refers to breaking the phosphodiester bonds of both  
10 strands of a DNA duplex or breaking the phosphodiester bond of single-stranded DNA. This is in contrast to nicking, which refers to breaking the phosphodiester bond of only one of the two strands in a DNA duplex.

The detector oligonucleotides of the invention for homogeneous real time fluorescent tSDA comprise a sequence that forms an intramolecularly base-paired secondary structure under the selected reaction conditions for primer extension or hybridization. The secondary structure is  
15 positioned adjacent to the target binding sequence of the detector oligonucleotide so that at least a portion of the target binding sequence forms a single-stranded 3' or 5' tail. As used herein, the term "adjacent to the target binding sequence" means that all or part of the target binding sequence is left single-stranded in a 5' or 3' tail which is available for hybridization to the target. That is, the secondary structure does not comprise the entire target binding sequence. A portion  
20 of the target binding sequence may be involved in the intramolecular base-pairing in the secondary structure, it may include all or part of a first sequence involved in intramolecular base-pairing in the secondary structure, it may include all or part of a first sequence involved in intramolecular base-pairing in the secondary structure but preferably does not extend into its complementary sequence. For example, if the secondary structure is a stem-loop structure (e.g.,  
25 a "hairpin") and the target binding sequence of the detector oligonucleotide is present as a single-stranded 3' tail, the target binding sequence may also extend through all or part of the first arm of the stem and, optionally, through all or part of the loop. However, the target binding sequence preferably does not extend into the second arm of the sequence involved in stem intramolecular base-pairing. That is, it is desirable to avoid having both sequences involved in  
30 intramolecular base-pairing in a secondary structure capable of hybridizing to the target. Mismatches in the intramolecularly base-paired portion of the detector oligonucleotide secondary structure may reduce the magnitude of the change in fluorescence in the presence of target but are acceptable if assay sensitivity is not a concern. Mismatches in the target binding sequence of the single-stranded tail are also acceptable but may similarly reduce assay sensitivity and/or  
35 specificity. However, it is a feature of the present invention that perfect base-pairing in both the



secondary structure and the target binding sequence do not compromise the reaction. Perfect matches in the sequences involved in hybridization improve assay specificity without negative effects on reaction kinetics.

When added to the amplification reaction, the detector oligonucleotide signal primers of the invention are converted to double-stranded form by hybridization and extension as described above. Strand displacement by the polymerase also unfolds or linearizes the secondary structure and converts it to double-stranded form by synthesis of a complementary strand. The RERS, if present, also becomes double-stranded and cleavable or nickable by the restriction endonuclease. As the secondary structure is unfolded or linearized by the strand displacing activity of the polymerase, the distance between the donor and acceptor dye is increased, thereby reducing quenching of donor fluorescence. The associated change in fluorescence of either the donor or acceptor dye may be monitored or detected as an indication of amplification of the target sequence. Cleavage or nicking of the RERS generally further increases the magnitude of the change in fluorescence by producing two separate fragments of the double-stranded secondary amplification product, each having one of the two dyes linked to it. These fragments are free to diffuse in the reaction solution, further increasing the distance between the dyes of the donor/acceptor pair. An increase in donor fluorescence intensity or a decrease in acceptor fluorescence intensity may be detected and/or monitored as an indication that target amplification is occurring or has occurred, but other fluorescence parameters which are affected by the proximity of the donor/acceptor dye pair may also be monitored. A change in fluorescence intensity of the donor or acceptor may also be detected as a change in a ratio of donor and/or acceptor fluorescence intensities. For example, a change in fluorescence intensity may be detected as a) an increase in the ratio of donor fluorophore fluorescence after linearizing or unfolding the secondary structure and donor fluorophore fluorescence in the detector oligonucleotide prior to linearizing or unfolding, or b) as a decrease in the ratio of acceptor dye fluorescence after linearizing or unfolding and acceptor dye fluorescence in the detector oligonucleotide prior to linearizing or unfolding.

It will be apparent that, in addition to SDA, the detector oligonucleotides of the invention may be adapted for use as signal primers in other primer extension amplification methods (e.g., PCR, 3SR, TMA or NASBA). For example, the methods may be adapted for use in PCR by using PCR amplification primers and a strand displacing DNA polymerase which lacks 5'→3' exonuclease activity (e.g., Sequencing Grade *Taq* from Promega or *exo<sup>-</sup>* Vent or *exo<sup>-</sup>* Deep Vent from New England BioLabs) in the PCR. The detector oligonucleotide signal primers hybridize to the target downstream from the PCR amplification primers, are displaced and are rendered double-stranded essentially as described for SDA. In PCR any RERS may optionally be selected

for use in the detector oligonucleotide, as there are typically no modified deoxynucleoside triphosphates present which might induce nicking rather than cleavage of the RERS. As thermocycling is a feature of amplification by PCR, the restriction endonuclease is preferably added at low temperature after the final cycle of primer annealing and extension for end-point  
5 detection of amplification. However, a thermophilic restriction endonuclease that remains active through the high temperature phases of the PCR reaction could be present during amplification to provide a real-time assay. As in SDA systems, separation of the dye pair reduces fluorescence quenching, with a change in a fluorescence parameter such as intensity serving as an indication of target amplification.

10 The change in fluorescence resulting from unfolding or linearizing of the detector oligonucleotides may be detected at a selected endpoint in the reaction. However, because linearized secondary structures are produced concurrently with hybridization or primer extension, the change in fluorescence may also be monitored as the reaction is occurring, i.e., in "real-time". This homogeneous, real-time assay format may be used to provide semiquantitative or  
15 quantitative information about the initial amount of target present. For example, the rate at which fluorescence intensity changes during the unfolding or linearizing reaction (either as part of target amplification or in non-amplification detection methods) is an indication of initial target levels. As a result, when more initial copies of the target sequence are present, donor fluorescence more rapidly reaches a selected threshold value (i.e., shorter time to positivity). The  
20 decrease in acceptor fluorescence similarly exhibits a shorter time to positivity, detected as the time required to reach a selected minimum value. In addition, the rate of change in fluorescence parameters during the course of the reaction is more rapid in samples containing higher initial amounts of target than in samples containing lower initial amounts of target (i.e., increased slope of the fluorescence curve). These or other measurements as is known in the art may be made as  
25 an indication of the presence of target or as an indication of target amplification. The initial amount of target is typically determined by comparison of the experimental results to results for known amounts of target.

Assays for the presence of a selected target sequence according to the methods of the invention may be performed in solution or on a solid phase. Real-time or endpoint homogeneous  
30 assays in which the detector oligonucleotide functions as a primer are typically performed in solution. Hybridization assays using the detector oligonucleotides of the invention may also be performed in solution (e.g., as homogeneous real-time assays) but are also particularly well-suited to solid phase assays for real-time or endpoint detection of target. In a solid phase assay, detector oligonucleotides may be immobilized on the solid phase (e.g., beads, membranes or the  
35 reaction vessel) via internal or terminal labels using methods known in the art. For example, a

biotin-labeled detector oligonucleotide may be immobilized on an avidin-modified solid phase where it will produce a change in fluorescence when exposed to the target under appropriate hybridization conditions. Capture of the target in this manner facilitates separation of the target from the sample and allows removal of substances in the sample which may interfere with  
5 detection of the signal or other aspects of the assay. An example of a solid phase system which can be used is an electronic microarray, i.e., an active programmable electronic matrix hybridization system.

A simplified version of the active programmable electronic matrix hybridization system for use with this invention is described as follows. Generally, a substrate supports a matrix or  
10 array of electronically addressable microlocations. A permeation layer is disposed above the individual electrodes. The permeation layer permits transport of relatively small charged entities through it, but precludes large charged entities, such as DNA from contacting the electrodes directly. The permeation layer avoids the electrochemical degradation that would occur in the DNA by direct contact with the electrodes. It further serves to avoid the strong, non-specific  
15 adsorption of DNA to electrodes. Attachment regions are disposed upon the permeation layer and provide for specific binding sites for target materials.

In operation, a reservoir comprises that space above the attachment regions that contains the desired (as well as undesired) materials for detection, analysis or use. Charged entities, such as charged DNA, are located within the reservoir. In one aspect, the active, programmable  
20 matrix system comprises a method for transporting the charged material to any of the specific microlocations. When activated, a microlocation generates the free field electrophoretic transport of any charged, functionalized, specific binding entity towards the electrode. For example, if one electrode were made positive and a second electrode negative, electrophoretic lines of force would run between two electrodes. The lines of electrophoretic force cause transport of charged  
25 binding entities that have a net negative charge toward the positive electrode. Charged materials having a net positive charge move under the electrophoretic force toward the negatively charged electrode. When the net negatively charged binding entity that has been functionalized contacts the attachment layer as a result of its movement under electrophoretic force, the functionalized specific binding entity becomes covalently attached to the attachment layer corresponding to the  
30 first electrode.

Electrophoretic transport generally results from applying a voltage, which is sufficient to permit electrolysis and ion transport within the system. Electrophoretic mobility results, and current flows through the system, such as by ion transport through the electrolyte solution. In this way, a complete circuit may be formed via the current flow of the ions, with the remainder of  
35 the circuit being completed by the conventional electronic components, such as the electrodes

and controlled circuitry. For example, for an aqueous electrolyte solution containing conventional material such as sodium chloride, sodium phosphate, buffers and ionic species, the voltage which induces electrolysis and ion transport is greater than, or equal to, approximately 1.2 volts.

5        It is possible to protect the attachment layers that are not subject to reaction by making their corresponding electrodes negative. This results in electrophoretic lines of force emanating from such attachment regions. The electrophoretic force lines serve to drive away negatively charged binding entities from the non-reactant attachment layer and towards the attachment layer corresponding to the first electrode. In this way, "force field" protection is formed around the  
10    attachment layers that it is desired to have nonreactive with the charged molecules at that time.

One highly advantageous result of this system is that charged binding materials may be highly concentrated in regions adjacent to the signal attachment layers. For example, if an individual microlocation is positively charged, and the remaining microlocations are negatively charged, the lines of electrophoretic force will cause transport of the net negatively charged  
15    binding entities toward the positively charged microlocation. In this way, a method for concentrating and reacting analytes or reactants at any specific microlocation on the device may be achieved. After the attachment of the specific binding entities to the attachment layer, the underlying microelectrode may continue to function in a direct current (DC) mode. This unique feature allows relatively dilute charged analytes or reactant molecules free in solution to be  
20    transported rapidly, concentrated, and reacted in a serial or parallel manner at any specific microlocation that is maintained at the opposite charge to the analyte or reactant molecules. This ability to concentrate dilute analyte or reactant molecules at selected microlocations greatly accelerates the reaction rates at these microlocations.

After the desired reaction is complete, the electrode may have its potential reversed,  
25    thereby creating an electrophoretic force in the direction opposite the prior attractive force. In this way, nonspecific analytes or unreacted molecules may be removed from the microlocation. Specific analytes or reaction products may be released from any microlocation and transported to other locations for further analysis, stored at other addressable locations, or removed completely from the system. This removal or deconcentration of materials by reversal of the field enhances  
30    the discrimination ability of the system by resulting in removal of nonspecifically bound materials. By controlling the amount of now-repulsive electrophoretic force to nonspecifically bound materials on the attachment layer, electronic stringency control may be achieved. By raising the electric potential at the electrode so as to create a field sufficient to remove partially hybridized DNA sequences, thereby permitting identification of single mismatched  
35    hybridizations, point mutations may be identified.

Operations may be conducted in parallel or in series at the various attachment layers. For example, a reaction may occur first at a first attachment layer, utilizing the potentials as shown. The potential at a first electrode may be reversed, that is, made negative, and the potential at the adjacent second electrode may be made positive. In this way, a series reaction occurs. Materials  
5 that were not specifically bound to the first attachment layer would be transported by electrophoretic force to the attachment layer. In this way, the concentration aspect is utilized to provide high concentrations at that specific attachment layer then subject to the positive electrophoretic force. The concentrated materials may next be moved to an adjacent, or other, attachment layer. Alternatively, multiple attachment layers may be deprotected in the sense that  
10 there is a net electrophoretic force field emanating from the electrode through the attachment layer out into the reservoir. By deprotecting the multiple attachment layer, multiplex reactions are performed. Each individual site may serve in essence as a separate biological "test tube" in that the particular environment addressed by a given attachment layer may differ from those environments surrounding the other attachment layers.

15 In one embodiment, the permeation layer contains avidin and one of the SDA primers contains biotin. Subsequent to amplification, the amplicons are electronically addressed onto the array and binds to the avidin. One or more labeled detector probes are then added and allowed to hybridize with the amplicons. The presence of hybridized detector probes is then detected. In a second embodiment, one or more capture probes are designed to hybridize with the amplified  
20 nucleic acid. Each capture probe contains biotin and is either bound onto or electronically addressed and bound onto an array in which the permeation layer contains avidin. The amplicons are then electronically addressed onto the array and hybridize with the capture probes. One or more labeled detector probes are then added and allowed to hybridize with the amplicons. The presence of hybridized detector probes is then detected.

25 Further details of the electronic microarray and associated systems are described by Heller et al. (1997, U.S. Patent No. 5,605,662; 1997, U.S. Patent No. 5,682,957; 1997, PCT published application No. WO97/12030), and Sosnowski et al. (1998, PCT published application No. WO98/10273), the disclosures of which are hereby specifically incorporated herein by reference.

30 In addition, techniques utilizing SDA and electronic microarrays, including several assay formats, are disclosed in copending application Serial No. 09/\_\_\_\_\_, filed concurrently herewith (Attorney Docket No. 235/139), incorporated herein by reference. In one embodiment, described in this application, a sandwich assay is used in which a single-stranded capture probe is electronically deposited on the array, and serves to capture one strand of a charged molecule such  
35 as target nucleic acid or amplicon thereof. A multiplicity of molecules such as nucleic acid

capture probes can be electronically deposited on different pads of the array. It is preferred that the hybridization of the target molecule or amplicon and the capture probe be conducted electronically. Following capture of the charged molecule to the capture sites, the captured molecule may be detected by a labeled reporter probe that binds to the captured molecule.

- 5 In a second embodiment described in this application, an electronic amplification is conducted on the microarray. In this embodiment, target nucleic acid is electronically concentrated in the vicinity of anchored primers located on a capture site and used in an SDA or other amplification method. Electronic hybridization is used to hybridize the template molecules to the anchored SDA primers. The microchips are then incubated with an SDA reaction mix  
10 which contains the SDA components other than the template and the amplification primers. After the reaction is stopped, the products are denatured, and the microchip incubated with reporter probes to detect the presence of target nucleic acid. These embodiments illustrate that (a) the amplification may be conducted on an electronic microarray followed by analysis or (b) the amplification may be conducted in solution and then analysis conducted on an electronic  
15 microarray.

#### EXAMPLES

- The following Examples illustrate specific embodiments of the invention described herein. As would be apparent to skilled artisans, various changes and modifications are possible,  
20 and are contemplated within the scope of the invention described.

#### EXAMPLE 1

##### Primer Screening

- All pairwise combinations of upstream and downstream amplification primers shown in  
25 Table I were tested for amplification of the target. Amplification reactions were conducted in the presence of  $10^6$  genomic equivalents of *C. jejuni* target DNA. The amplification reactions were conducted at 52° C in buffers containing final concentrations of the following components: 30-40 mM potassium phosphate (pH 7.6), 5-9% glycerol, 3-7% dimethylsulfoxide (DMSO), 5 mM magnesium acetate, 700 ng human placental DNA, 10 µg acetylated bovine serum  
30 albumin, 1.82% trehalose, 0.36 mM dithiothreitol, 500 nM SDA primers, 50 nM SDA bumper primers, 0.25 mM dUTP, 0.7 mM 2'-deoxycytidine 5'-O-(1-thiotriphosphate), 0.1 mM dATP, 0.1 mM dGTP, and approximately 640 units *Bso*BI and 40 units *Bst* polymerase.

- In brief, target DNA was denatured for 5 minutes at 95° C and cooled to room temperature prior to addition to a buffer containing the SDA primers and bumpers. Incubation  
35 was continued at room temperature for 20 minutes, followed by incubation at 70° C for 10

minutes to minimize potential false priming. Amplification was then initiated at 52° C by transfer of a fixed volume of the priming mix to microtiter wells containing the amplification enzymes. Amplification was carried out for 1 hour at a constant temperature of 52° C. SDA amplification products were detected by autoradiography following primer extension with <sup>32</sup>P-labeled detector sequences SEQ ID NO:9 and SEQ ID NO:10 and resolution in 8% denaturing polyacrylamide gels. Specific amplification products were detected with all 9 primer combinations tested.

#### EXAMPLE 2

##### 10 Determination of Analytical Sensitivity

SDA was performed as described Example 1 with amplification primers SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:5, and SEQ NO:2 and SEQ ID NO:5. Target DNA was included at 0, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, or 10<sup>5</sup> genomic equivalents per reaction. An analytical sensitivity of 10<sup>3</sup> targets was achieved.

15

#### EXAMPLE 3

##### Evaluation of Primer Specificity

Primer specificity was evaluated using SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, and SEQ ID NO:8 as described in Example 1 with 30mM potassium phosphate, 9% glycerol and 20 3% DMSO. Thirty-four strains of *C. jejuni* and *C. coli* were tested at 10<sup>5</sup> genomic equivalents per reaction (Table 2). All thirty-four of the strains tested positive for a calculated specificity of 100%.

TABLE 2*Campylobacter* Specificity Panel

Species	Strain
<i>C. jejuni</i>	ATCC 33291
<i>C. jejuni</i>	ATCC 33292
<i>C. jejuni</i>	ATCC 49349
<i>C. jejuni</i>	ATCC 29428
<i>C. jejuni</i>	ATCC 33560
<i>C. jejuni</i>	ATCC 49943
<i>C. jejuni</i>	T-401
<i>C. jejuni</i>	T-402
<i>C. jejuni</i>	T-403
<i>C. jejuni</i>	T-404
<i>C. jejuni.</i>	T-405
<i>C. jejuni.</i>	T-407
<i>C. jejuni.</i>	T-408
<i>C. jejuni.</i>	T-410
<i>C. jejuni</i>	T-411
<i>C. jejuni</i>	T-413
<i>C. coli</i>	ATCC 43474
<i>C. coli</i>	ATCC 33559
<i>C. coli</i>	ATCC 49941
<i>C. coli</i>	ATCC 43472
<i>C. coli</i>	ATCC 43473
<i>C. coli</i>	ATCC 43475
<i>C. coli</i>	ATCC 43476
<i>C. coli</i>	ATCC 43477
<i>C. coli</i>	ATCC 43479
<i>C. coli</i>	ATCC 43481
<i>C. coli</i>	ATCC 43482
<i>C. coli</i>	ATCC 43483
<i>C. coli</i>	ATCC 43484
<i>C. coli</i>	ATCC 43486
<i>C. coli</i>	ATCC 43489
<i>C. coli</i>	ATCC 43499
<i>C. coli</i>	T-449
<i>C. coli</i>	T-834



## EXAMPLE 4

Evaluation of Cross-Reactivity

Cross-reactivity was evaluated using the primers and reaction conditions described in Example 3. Non *C. jejuni* and *C. coli* organisms were tested with 10<sup>7</sup> genomic equivalents per reaction. Negative results were obtained with all 20 organisms tested (Table 3). In all cases, when 10<sup>4</sup> copies of *C. jejuni* target DNA were seeded into the reactions, specific product was obtained indicating the absence of amplification inhibition.

TABLE 3

*Campylobacter* Cross-Reactivity Panel

Species	Serotype 1	Strain
<i>Actinomyces israelii</i>		ATCC 10049
<i>Arcobacter butzleri</i>		ATCC 49616
<i>Bacteroides ureolyticus</i>		ATCC 33387
<i>Campylobacter lari</i>		ATCC 43675
<i>Candida albicans</i>		ATCC 44808
<i>Citrobacter freundii</i>		ATCC 8090
<i>Enterobacter cloacae</i>		ATCC 13047
<i>Enterococcus faecalis</i>		ATCC 29212
<i>Escherichia coli</i>		T-4025
<i>Escherichia</i>		T-3785
<i>Helicobacter pylori</i>		ATCC 43526
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	subsp. <i>pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Proteus mirabilis</i>		ATCC 29906
<i>Salmonella typhimurium</i>		ATCC 13311
<i>Shigella sonnei</i>		ATCC 29029
<i>Staphylococcus aureus</i>	subsp. <i>aureus</i>	ATCC 12598
<i>Streptococcus bovis</i>		ATCC 9809
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Group A	ATCC 19615
<i>Vibrio cholerae</i>	Biotype eltor	ATCC 14035
<i>Yersinia enterocolitica</i>		ATCC 9610

## EXAMPLE 5

Electronic Microarray Analysis

The microelectronic array assembly has been described previously (R.G. Sosnowski et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:119-123). Electronic targeting of capture probes, amplicons or detector probes utilized conditions reported elsewhere (R.G. Sosnowski et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:119-123; C.F. Edman et al., 1997, *Nucleic Acids Res.*

25:4907-4914). The permeation layer of the microelectronic array assembly advantageously contains avidin. In brief, capture probes are electronically addressed onto a microelectronic array. Crude amplification reactions are either spun for 2 min through G6 columns (Biorad, Hercules, CA) preequilibrated with distilled water or dialyzed in multiwell plates (Millipore, Bedford, MA) for ≥ 5 hrs against distilled water. The prepared samples are then mixed in a 1:1 ratio with 100 mM histidine and heated at 95° C for 5 min prior to electronic addressing. For detection, a fluorescent labeled oligonucleotide (detector probe) is introduced in 6XSSC and allowed to hybridize for 30 min at room temperature. The array is then washed in 0.1XSTE/1%SDS followed by 1XSTE. The presence of detector probe is then detected.

While the invention has been described with some specificity, modifications apparent to those of ordinary skill in the art may be made without departing from the scope of the invention. Various features of the invention are set forth in the following claims.

## SEQUENCE LISTING

<110> McMillian, Ray A.  
Port, Thomas L.  
Hellyer, Tobin J.  
You, Qimin

<120> Amplification and Detection of *Campylobacter jejuni* and  
*Campylobacter coli*.

<130> C. jejuni and C. coli Application

<140>  
<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer for SDA  
of C. jejuni and C. coli

<400> 1  
cgattccgct ccagacttct cgggcaggat ggttttggtt 40

<210> 2  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer for SDA  
of C. jejuni and C. coli

<400> 2 ''  
cgattccgct ccagacttct cgggcaggat ggttttggt 39

<210> 3  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer for SDA  
of C. jejuni and C. coli

<400> 3  
 cgattccgct ccagacttct cgggcaggat ggtttttg  
 38

<210> 4  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer for SDA  
 of C. jejuni and C. coli

<400> 4  
 accgcatcga atgcatgtct cggggaagta cctacaaatt ct  
 42

<210> 5  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer for SDA  
 of C. jejuni and C. coli

<400> 5  
 accgcatcga atgcatgtct cgggaagtac ctacaaattc t  
 41

<210> 6  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer for SDA  
 of C. jejuni and C. coli

<400> 6  
 accgcatcga atgcatgtct cgggagtacc tacaaattct  
 40

<210> 7  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:Bumper for SDA  
 for C. jejuni and C. coli

<400> 7  
 acaggagttt ttggtt  
 16

<210> 8

```

<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Bumper for SDA
      for C. jejuni and C. coli

<400> 8
aataggtgta gctgc                                15

<210> 9
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Detector Probe
      for SDA for C. jejuni and C. coli

<400> 9
ggttagttta taatact                              17

<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Detector Probe
      for SDA for C. jejuni and C. coli

<400> 10
ctagtttttg atttttagt                            19

```

## **1. Abstract**

### **ABSTRACT**

Amplification primers and methods for specific amplification and detection of a *Campylobacter jejuni* and *C. coli* target are disclosed. The primer-target binding sequences are useful for amplification and detection of *C. jejuni* and *C. coli* target in a variety of amplification and detection reactions.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2000-316590  
(P2000-316590A)

(43) 公開日 平成12年11月21日 (2000. 11. 21)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A

審査請求 未請求 請求項の数12 O L 外国語出願 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-110098 (P2000-110098)	(71) 出願人	595117091 ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー BECTON, DICKINSON AND COMPANY アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー 07417-1880 フランクリン・レイクス ベクトン・ドライブ 1
(22) 出願日	平成12年4月12日 (2000. 4. 12)	(72) 発明者	レイ・エイ・マクミリアン アメリカ合衆国メリーランド州21093, ティモニアム, レスター・ドライブ 714
(31) 優先権主張番号	09/289747	(74) 代理人	100099623 弁理士 奥山 尚一 (外2名)
(32) 優先日	平成11年4月12日 (1999. 4. 12)		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

- (54) 【発明の名称】 カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) およびカンピロバクター・コリ (*Campylobacter coli*) の増幅および検出
- (57) 【要約】 (修正有)
- 【課題】 患者中のカンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) およびカンピロバクター・コリ (*Campylobacter coli*) の存在の有無を判定する。
- 【解決手段】 *C. jejuni* (*C. jejuni*) および *C. coli* (*C. coli*) 標的を特異的に増幅し、検出するための増幅プライマーおよび方法を開示する。プライマー標的結合配列は、種々の増幅検出反応において *C. jejuni* (*C. jejuni*) および *C. coli* (*C. coli*) 標的を増幅して、検出するのに有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 AL46（配列番号1）、AL44（配列番号2）、AL42（配列番号3）、AR48（配列番号4）、AR44（配列番号5）およびAR42（配列番号6）の標的結合配列からなる群から選択される標的結合配列と、任意選択により、増幅反応に必要な配列とからなるオリゴヌクレオチド。

【請求項 2】 増幅反応に必要な配列が、鎖置換増幅中に制限エンドヌクレアーゼによってニックが入れられる制限エンドヌクレアーゼ認識部位である請求項 1 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 3】 BL42（配列番号7）またはBR42（配列番号8）からなるオリゴヌクレオチド。

【請求項 4】 DL52（配列番号9）、配列番号9に相補的な核酸、DR48（配列番号10）および配列番号10に相補的な核酸からなる群から選択されるオリゴヌクレオチド。

【請求項 5】 a) AL46（配列番号1）、AL44（配列番号2）およびAL42（配列番号3）からなる群から選択される1種以上のプライマーと、

b) AR48（配列番号4）、AR44（配列番号5）およびAR42（配列番号6）からなる群から選択される1種以上のプライマーと、

c) バンパーであるBL42（配列番号7）およびBR42（配列番号8）と、

d) DL52（配列番号9）、配列番号9に相補的な核酸、DR48（配列番号10）および配列番号10に相補的な核酸からなる群から選択される1種以上の検出用配列とを含んでなるキット。

【請求項 6】 試料中のC. ジェジュニ（*C. jejuni*）またはC. コリ（*C. coli*）の存在の有無を検出するための方法であって、

a) 核酸増幅反応において一対の核酸プライマーを使用して前記試料を処理するステップであって、第1のプライマーがAL46（配列番号1）、AL44（配列番号2）およびAL42（配列番号3）からなる群から選択され、第2のプライマーがAR48（配列番号4）、AR44（配列番号5）およびAR42（配列番号6）からなる群から選択されるステップと、

b) 増幅された任意の核酸産物を検出するステップとを含み、増幅された産物の検出がC. ジェジュニ（*C. jejuni*）およびC. コリ（*C. coli*）の存在を示す方法。

【請求項 7】 増幅された前記核酸産物を検出するステップが、増幅された前記核酸産物をDL52（配列番号9）、配列番号9に相補的な核酸、DR48（配列番号10）および配列番号10に相補的な核酸からなる群から選択される検出用配列とハイブリダイゼーションすることによって実施される請求項6に記載の方法。

【請求項 8】 増幅反応、検出、または増幅反応および検出の両方がエレクトロニックマイクロアレイを使用する請求項6に記載の方法。

【請求項 9】 C. ジェジュニ（*C. jejuni*）およびC. コリ（*C. coli*）の標的核酸配列を増幅するための方法であって、

a) i) AL46（配列番号1）、AL44（配列番号2）およびAL42（配列番号3）の標的結合配列からなる群から選択される標的結合配列と、任意選択により、増幅反応に必要な配列とからなる群から選択される第1の増幅プライマーと、

ii) AR48（配列番号4）、AR44（配列番号5）およびAR42（配列番号6）の標的結合配列からなる群から選択される標的結合配列と、任意選択により、増幅反応に必要な配列とからなる第2の増幅プライマーとを核酸にハイブリダイゼーションするステップと、

b) ハイブリダイゼーションした第1および第2の増幅プライマーを標的核酸配列に伸長させることによって、標的核酸配列を増幅するステップとを含む方法。

【請求項 10】 検出プローブにハイブリダイゼーションすることによって増幅した標的核酸を検出するステップをさらに含む請求項9に記載の方法。

【請求項 11】 検出プローブが、検出可能な標識で標識したDL52（配列番号9）またはDR48（配列番号10）からなる請求項10に記載の方法。

【請求項 12】 増幅反応、検出、または増幅反応および検出の両方がエレクトロニックマイクロアレイを使用する請求項10に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】 技術分野

本発明は、患者中のカンピロバクター・ジェジュニ（*Campylobacter jejuni*）およびカンピロバクター・コリ（*Campylobacter coli*）の存在の有無を判定するための方法に関する。本発明の方法は、好ましくは、鎖置換増幅（Strand Displacement Amplification (SDA)）、好熱性鎖置換増幅（thermophilic Strand Displacement Amplification (tSDA)）または蛍光リアルタイムtSDAの技法の1つを使用し、任意選択的にマイクロエレクトロニックアレイを使用してC. ジェジュニ（*C. jejuni*）およびC. コリ（*C. coli*）のスーパーオキシドジムスターゼ（sodB）遺伝子を特異的に増幅する核酸プライマーを使用することを含む。

## 【0002】 発明の背景

C. ジェジュニ（*C. jejuni*）およびC. コリ（*C. coli*）は全世界にわたってヒトの急性下痢疾患の重要な原因であると認識されている。核酸増幅は、特異的な標的配列の迅速な検出を可能にする強力な技術である。従って、核酸増幅は、C. ジェジュニ（*C. jejuni*）およびC. コリ（*C. coli*）の迅速な検出および同定を可能にする有望な技術である。本発明のオリゴヌクレオチドプライマーは、スーパーオキシドジムスターゼ（sodB）遺伝子のC. ジェジュニ（*C. jejuni*）特異的領域およびC. コリ（*C. coli*）特異的領域の核酸増幅および検出に適用できる。

SodB遺伝子はサイズが約900塩基対で、空中および感染中の*C. ジェジュニ* (*C. jejuni*) および*C. コリ* (*C. coli*) の生存に重要である。

【0003】以下の用語は本明細書において以下のように定義される。増幅プライマーは、標的配列にハイブリダイゼーションした後にプライマーを伸長することによって標的配列を増幅するためのプライマーである。増幅プライマーは、一般に、鎖長約10~75ヌクレオチドであり、好ましくは鎖長約15~50ヌクレオチドである。SDA用の増幅プライマーの総鎖長は、一般に、約25~50ヌクレオチドである。SDA増幅プライマーの3'末端(標的結合配列)は、標的配列の3'末端にハイブリダイゼーションする。標的結合配列は鎖長約10~25ヌクレオチドであり、増幅プライマーにハイブリダイゼーションの特異性を与える。SDA増幅プライマーは、さらに、標的結合配列に対する制限エンドヌクレアーゼ5'の認識部位を含む。認識部位は、ウォルカー (G. Walker) ら (1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 392-396および1992 *Nucl. Acids Res.* 20:1691-1696) によって記載されているように、認識部位が半改変される場合に、DNA二重らせんの一方の鎖にニックを入れる制限エンドヌクレアーゼのためである。制限エンドヌクレアーゼ認識部位の5'末端(「テール」)は、増幅プライマーの残りがSDA中にニックを入れられ、置換される場合にポリメラーゼリプライミング部位として機能する。テールヌクレオチドのリプライミング機能はSDA反応を持続させ、一標的分子から多数のアンプリコンの合成を可能にする。テールは、一般に、鎖長約10~25ヌクレオチドである。テールの鎖長および配列は一般に重大ではなく、日常的に選択され、改変され得る。標的結合配列は、標的の特異性を決定するプライマーの一部であるので、標的の末端部において特定の配列を必要としない増幅方法では、一般に、増幅プライマーは本質的に標的結合配列だけからなる。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction (PCR)) を使用した本発明による標的配列の増幅は、本明細書に記載する増幅プライマーの標的結合配列からなる特定の増幅プライマーを使用する。ニックを入れることが可能な制限エンドヌクレアーゼ認識部位およびSDAのテール以外に標的に付加される配列(例えば、自己持続型配列複製 (Self-Sustained Sequence Replication (3SR))、核酸配列をベースとした増幅 (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)) または転写をベースとした増幅システム (Transcription-Based Amplification System (TAS)) のRNAポリメラーゼプロモーター)を必要とする増幅方法では、必要な特定の配列は、プライマーのハイブリダイゼーション特異性を変更することなく、オリゴヌクレオチドを製造する通常の方法を使用して標的結合配列に連結することができる。

【0004】バンパープライマー、すなわち外部プライ

マーは、等温増幅反応においてプライマー伸長産物を置換するために使用するプライマーである。バンパープライマーの伸長が下流の増幅プライマーおよびその伸長産物と置換するように、バンパープライマーは増幅プライマーの標的配列の上流にアニーリングする。

【0005】標的または標的配列という用語は、増幅される核酸配列をいう。これらには、増幅される核酸配列、増幅される元の核酸配列に相補的な第2の鎖および増幅反応によって産生される元の配列のコピーの一方の鎖が含まれる。これらのコピーは、増幅プライマーがハイブリダイゼーションする配列のコピーを含有することにより増幅可能な標的として作用する。

【0006】増幅反応の間に作製される標的配列のコピーは、増幅産物、アンプリマーまたはアンプリコンと呼ばれる。

【0007】伸長産物という用語は、プライマーのハイブリダイゼーションおよび鋳型として標的配列を使用したポリメラーゼによるプライマーの伸長によって作製される標的配列のコピーをいう。

【0008】種特異的という用語は、同じ属の他の種または異なる属の種の実質的な検出、増幅またはオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを生じることなく、ある種の生物または関連する種の群を検出、増幅またはオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションすることをいう。

【0009】アッセイプローブという用語は、核酸の検出または同定を容易にするために使用する任意のオリゴヌクレオチドをいう。以下に記載されている検出プローブ、犬種rつプライマー、捕獲プローブ、シグナルプライマーおよびレポータープローブはアッセイプローブの例である。

【0010】アンプリコンという用語は、増幅プライマーの対の一方または両方を伸長することによって作製される増幅反応の産物をいう。使用する両プライマーが標的配列にハイブリダイゼーションする場合には、アンプリコンは指数的に増幅した核酸を含有する。または、使用するプライマーの一方が標的配列にハイブリダイゼーションしない場合には、アンプリコンは線形増幅によって作製され得る。従って、この用語は本明細書において総称的に使用され、指数的に増幅する核酸の存在を意味するものではない。

【0011】マイクロエレクトロニックアレイ(またはエレクトロニックマイクロアレイ)は、電子的に自己位置指定可能な微視的位置の並びを有する装置である。各微視的位置は、基材に支持され、基底で作動する直流(DC)微小電極を含有する。各微小位置の表面は、小さい対イオンの自由輸送のための透過層と特異的な結合要素が共有結合するための結合層とを有する。

【0012】アレイまたはマトリックスは装置上の位置の並びである。位置は二次元列、三次元列または他のマ

トリックス形式で並べられる。位置の数は数個から数十万個の範囲であってもよい。

【0013】電子的位置指定（または標的化）は、特異的な試験部位に荷電分子を置くことである。DNAは強い負電荷を有するので、電子の作用により正電荷領域に移動することができる。マイクロチップ上の試験部位または試験部位の並びは、正電荷で電子的に活性化される。DNAプローブの溶液をマイクロチップに導入する。負に荷電したプローブは正に荷電した部位に速やかに移動し、そこで濃縮し、その部位に化学的に結合する。次いで、マイクロチップを洗浄し、別個のDNAプローブの別溶液を添加することができる。部位ごとに、並びごとに、特異的に結合したDNAプローブのアレイがマイクロチップ上に集成または位置指定され得る。特異的な部位に捕獲プローブを電子的に位置指定する能力を用いると、このシステムではマイクロチップ上に特異的な捕獲プローブを置くことによって特注のアレイの作製が可能になる。これに関連して、「電子的に位置指定可能な」という用語は、チップの捕獲部位に電子的にバイアスをかけることによって核酸および酵素並びに他の増幅成分などの材料をマイクロチップのある位置から別の位置に差し向けるマイクロチップの能力をいう。「電子的にバイアスをかける」は、マイクロチップに接触する溶液中の分子をマイクロチップのある位置に向かうもしくはある位置から離れるまたはある位置から別の位置に差し向けられることができるように、マイクロチップ上の一捕獲部位または別の位置の電子電荷が正味正電荷と正味負電荷の間に操作できることを意味することが意図されている。

【0014】電子の濃縮およびハイブリダイゼーションはマイクロチップ上の1カ所以上の試験部位（すなわち、捕獲部位）に標的分子を移動し、濃縮する電子を使用する。各試験部位の試料DNAの電子の濃縮は試料DNAと相補的な捕獲プローブとの迅速なハイブリダイゼーションを促進する。受動的なハイブリダイゼーション過程とは異なり、電子濃縮過程はハイブリダイゼーションの速度を有意に加速するという明白な利点を有する。各部位から未結合のDNAまたは非特異的な結合のDNAを除去するために、その部位の極性または荷電を負に逆転させ、それによって未結合または非特異的な結合のいかなるDNAをも捕獲プローブから溶液に戻させる。また、試験分子は試験部位に電子的に濃縮されるので、低濃度の標的DNA分子が必要であり、従って予備試験の試料調製に必要な時間と労力が削減される。「捕獲部位」という用語は、電子的なバイアスがかけられ、核酸プローブおよび標的分子がこのようなバイアスによって結合または位置指定される、電子的に位置指定可能なマイクロチップの特異的な位置をいう。

【0015】電子的厳密性制御(electronic stringency control)は、ハイブリダイゼーション過程の一部とし

て未結合および非特異的な結合DNAを迅速かつ容易に除去するための電位の逆転である。電子的な厳密性により、ハイブリダイゼーション過程の品質が管理され、DNAのいかなる結合対も真に相補的であることが確実となる。電子的厳密性過程において制御された電流の送達を使用することにより、プラットフォーム技術の精度、制御性および正確度は、1カ所の点変異、1カ所の塩基対のミス対合または他の遺伝的変異の検出を可能にし、数多くの診断および研究への応用において意義ある適応となり得る。従来の方法で同じ結果を得るのに必要なめんどろな処理および取り扱いを行うことなく電子的厳密性は達成される。受動的なアレイとは異なり、本発明の技術は短鎖および長鎖の一本鎖DNA断片を収容することができる。より長いプローブを使用することにより、捕獲プローブとハイブリダイゼーションするDNAが適切な標的となる確実性が増す。電子的緊縮制御は、従来のDNAアレイと比較して必要なプローブ数、従ってマイクロチップ上の試験部位数を低下する。一方、伝統的な受動的なハイブリダイゼーション過程は制御が困難であり、適切な対合が正に同定され得るように全ての可能な塩基対対合のより多くの複製物を必要とする。

【0016】電子的多重送信(electronic multiplexing)は、一試料からの多数試験の同時解析を可能にする。同一マイクロチップ上の生化学的に関連のない分子の同時使用を可能にする電子的多重送信は、（捕獲プローブまたは捕獲分子の位置指定および試験試料分子の濃縮のために）個々の試験部位を個別に制御する能力によって容易にされる。従来のDNAアレイ上の部位は個別に制御できないので、同一の過程段階はアレイ全体で実施しなければならない。本発明の技術では電子を使用することにより、このような従来の方法に比べて融通性および柔軟性が高くなる。

#### 【0017】発明の概要

本発明は、C. ジェジュニ (C. jejuni) およびC. コリ (C. coli) 中に見いだされるsodB標的配列を増幅するために使用することができるオリゴヌクレオチドプライマーを提供する。さらに詳細には、標的配列はsodB遺伝子セグメントを含む。増幅プライマーは、tSDAおよびPCRなどの高温における高効率、高特異性増幅のために設計されたが、それらは、従来のSDA、3SRまたはNASBAなどの比較的低温での増幅反応においても有用である。増幅される標的のアッセイ領域にハイブリダイゼーションするオリゴヌクレオチドアッセイプローブは、増幅産物を検出するために使用される。

【0018】本発明のオリゴヌクレオチドは、培養された生物の正体を確認するための手段として培養後に使用されてもよい。または、既知の増幅方法を使用してC. ジェジュニ (C. jejuni) およびC. コリ (C. coli) の核酸を検出および同定するために、糞もしくは尿などのヒトもしくは動物の臨床試料または汚染食物もしくは飲料水



試料とともに使用されてもよい。どちらの場合でも、本発明のオリゴヌクレオチドおよびアッセイ方法は、*C. ジェジュニ* (*C. jejuni*) および *C. コリ* (*C. coli*) と、他の微生物とを迅速に識別するための手段となり、それによって担当者は従来頼りにされていたより伝統的な手法を使用しないでこの微生物を迅速に同定することができる。ある種の感染症に関与する特定の病原菌をこのように迅速に同定することは、短い期間のうちに適当な行動を決定するために使用することができる情報を提供する。

【0019】配列番号1~3は、*C. ジェジュニ* (*C. jejuni*) および *C. コリ* (*C. coli*) の *sodB* 遺伝子の増幅のための上流プライマーとして使用するオリゴヌクレオチドの配列である。配列番号4~6は、*C. ジェジュニ* (*C. jejuni*) および *C. コリ* (*C. coli*) の *sodB* 遺伝子の増幅のための下流プライマーとして使用するオリゴヌクレオチドの配列である。配列番号7は、*SDA* 増幅の上流バンパーとして使用するオリゴヌクレオチドの配列である。配列番号8は、*SDA* 増幅の下流バンパーとして使用するオリゴヌクレオチドの配列である。配列番号9~10は、*C. ジェジュニ* (*C. jejuni*) および *C. コリ* (*C. coli*) の *sodB* 遺伝子の検出オリゴヌクレオチド（プローブまたはレポーター）の配列である。

#### 【0020】発明の詳細な説明

本発明は、核酸増幅反応において *C. ジェジュニ* (*C. jejuni*) および *C. コリ* (*C. coli*) に特異性を示すオリゴヌクレオチド、増幅プライマーおよびアッセイプローブに関する。また、本発明のオリゴヌクレオチドを使用して *C. ジェジュニ* (*C. jejuni*) および *C. コリ* (*C. coli*) の

*sodB* の核酸を検出し、同定するための方法も提供される。好ましい方法は *SDA*、*tSDA* または均一リアルタイム蛍光 *tSDA* を使用することである。これらの方法は、それらの開示内容を参照することにより、特に本明細書に組み入れられている、米国特許第5,547,861号、米国特許第5,648,211号、米国特許第5,846,726号および1997年5月30日に提出された米国特許出願番号08/865,675号などの参照文献から当業者に周知である。核酸の分析のためのマイクロエレクトロニックアレイの使用は、米国特許第5,605,662号および米国特許第5,632,957号並びに *PC T* 出願国際公開公報第96/01836号および国際公開公報第97/12030号などの参照文献から当業者に周知である。

【0021】本発明のプライマーは *GenBank* から入手可能なゲノム *sodB* に基づいて設計された。*C. ジェジュニ* (*C. jejuni*)、*C. コリ* (*C. coli*)、ヘリコバクターピロリ (*Helicobacter pylori*) および大腸菌 (*Escherichia coli*) の配列を比較した。*GeneWorks* ソフトウェアを用いてこれらの配列を編集して、アラインメントを作成し、配列の相同性を求めた。*DNA* 整列研究から、*C. ジェジュニ* (*C. jejuni*) と *C. コリ* (*C. coli*) の間には600塩基対領域に89%の相同性があることが同定された。*SDA* に使用するために開発したプライマーを表1に示す。得られたアンプリコンの検出のためのプローブも示してある。増幅プライマーにおける例示的な制限エンドヌクレアーゼ認識部位 (*BsoBI*) を下線で示し、標的結合配列を斜字で示す。増幅プライマーの標的結合配列は標的の特異性を決定する。

#### 【0022】

【表1】

#### 増幅オリゴヌクレオチド

##### 上流プライマー

AL46: 5'-CGATTCCGCTCC AGACTTCTCGGGCAGGATGGTTTTGGTT(配列番号1)

AL44: 5'-CGATTCCGCTCCAGACTTCTCGGGCAGGATGGTTTTGGTT(配列番号2)

AL42: 5'-CGATTCCGCTCCAGACTTCTCGGGCAGGATGGTTTTGGTT(配列番号3)

##### 下流プライマー

AR48: 5'-ACCGCATCGAATGCATGTCTCGGGGAAGTACCTACAAATTCT(配列番号4)

AR42: 5'-ACCGCATCGAATGCATGTCTCGGGGAAGTACCTACAAATTCT(配列番号5)

AR42: 5'-ACCGCATCGAATGCATGTCTCGGGAGTACCTACAAATTCT(配列番号6)

##### 上流バンパー

BL42: 5'-ACAGGAGTTTTTGGTT(配列番号7)

##### 下流バンパー

BR42: 5'-AATAGGTGTAGCTGC(配列番号8)

##### 検出プローブ

DL52: 5'-GGTTAGTTTATAATACT(配列番号9)

DR48: 5'-CTAGTTTTTGATTTTGTAGT(配列番号10)

【0023】核酸は、ハイブリダイゼーションするために完全な相補性を必要としないので、*C. ジェジュニ* (*C. jejuni*) と *C. コリ* (*C. coli*) に特異的プローブおよびプライマーとしての利用性を損失しない程度に本明細書

に開示されているプローブおよびプライマー配列を改変できることが理解されるべきである。当技術上知られているように、相補的な核酸配列および部分的に相補的な核酸配列のハイブリダイゼーションは、厳密性を増加ま

たは低下するようにハイブリダイゼーション条件を調整することによって実施することができる（すなわち、ハイブリダイゼーション pH、温度または緩衝液の塩濃度の調整）。開示されている配列のこのようなわずかな変更および *C. ジェジュニ* (*C. jejuni*) と *C. コリ* (*C. coli*) に特異性を維持するために必要なハイブリダイゼーション条件の任意の調整には日常的な実験しか必要ではなく、当技術上の通常の技術の範囲内である。

【0024】本明細書において開示されているプライマーを使用して作製される増幅産物は、例えば、臭化エチジウムで染色したポリアクリルアミドまたはアガロースゲル上で特徴的なサイズによって検出することができる。または、増幅した標的配列は、検出可能な標識で標識されたオリゴヌクレオチドであるアッセイプローブによって検出することができる。一実施態様において、ハイブリダイゼーションによって（検出プローブ）、Walker ら（1992, *Nucl. Acids Res.* 22: 1691-1696）によって記載されているようにハイブリダイゼーションおよび伸長によって（検出プライマー）または欧州特許第 0 678 582 号に記載されているようにハイブリダイゼーション、伸長および二本鎖形態への変換によって（シグナルプライマー）、増幅した標的配列を検出するために少なくとも 1 つの標識されたアッセイプローブを使用することができる。配列番号 9 および配列番号 10 は、検出プライマー、すなわち、*C. ジェジュニ* (*C. jejuni*) と *C. コリ* (*C. coli*) を検出するための本発明の増幅プライマーと併用したプライマー伸長検出プローブとして特に有用である。好ましくは、アッセイプローブは、増幅プライマーの間にある標的の配列にハイブリダイゼーションするように選択される。すなわち、それは内部アッセイプローブでなければならない。または、増幅プライマーまたはその標的結合配列はアッセイプローブとして使用することができる。

【0025】アッセイプローブの検出可能な標識は、標的核酸の存在を示すものとして直接または間接的に検出できる部分である。標識を直接検出するためには、当技術上周知であるように、アッセイプローブを放射性同位体で標識し、オートラジオグラフィーで検出する、または蛍光部分で標識して蛍光によって検出することができる。または、標識を検出可能にする別の試薬を必要とする標識で標識することによってアッセイプローブを間接的に検出することができる。間接的に検出可能な標識には、例えば、化学発光剤、目に見える反応生成物を産生する酵素および標識した特異的な結合相手（例えば、抗体または抗原/ハプテン）に結合することによって検出することができるリガンド（例えば、ハプテン、抗体または抗原）が含まれる。リガンドは、リガンドで標識したオリゴヌクレオチド（捕獲プローブ）を固相に固定してその検出を容易にするために有用である。特に有用な標識にはビオチン（標識したアビジンまたはストレプト

アビジンに結合することによって検出可能）およびセイヨウワサビペルオキシダーゼまたはアルカリ性ホスファターゼなどの酵素（着色した反応生成物を産生する酵素基質を添加することによって検出可能）が含まれる。オリゴヌクレオチドにこのような標識を添加するための方法またはオリゴヌクレオチドにこのような標識を含ませるための方法は当技術上周知であり、これらの方法の任意のものが本発明に使用するために好適である。

【0026】使用することができる特異的な検出方法の例には、米国特許第 5,470,723 号に記載されているビオチン化捕獲プローブおよび酵素結合検出プローブを使用して増幅産物を検出する化学発光方法が含まれる。これら 2 つのアッセイプローブを標的配列のアッセイ領域の異なる部位（2 つの増幅プライマーの結合部位間）にハイブリダイゼーションした後に、複合体は捕獲プローブによってストレプトアビジンを被覆したマイクロタイタープレートに捕獲され、化学発光信号を発生し、ルミノメーターで読まれる。増幅産物を検出する別法として、欧州特許第 0 678582 号に記載されているシグナルプライマーを SDA 反応に加えてもよい。この実施態様では、標識された第 2 の増幅産物が SDA 中に標的増幅依存的な方法で作製され、結合した標識によって標的増幅を示すものとして検出することができる。

【0027】市販上簡便にするために、核酸を特異的に検出し、同定するための増幅プライマーはキットの形態で包装されてもよい。一般に、このようなキットは少なくとも 1 対の増幅プライマーを含有する。例えば、緩衝液、別のプライマー、ヌクレオチド三リン酸、酵素等のような、核酸増幅反応を実施するための試薬を標的増幅プライマーに加えることもできる。キットの構成要素は、本発明の方法の具体的な実施態様を実施するための取扱説明書を任意に加えて、通常の容器に包装される。例えば、アッセイプローブとして使用するのに好適な標識で標識したオリゴヌクレオチドおよび/または標識を検出するための試薬または手段のような他の任意の構成要素をキットに加えることもできる。

【0028】増幅プライマーの標的結合配列は、オリゴヌクレオチドにハイブリダイゼーションの種特異性を与えるので、増幅反応に種特異性を提供する。従って、本発明の増幅プライマーの標的結合配列は、PCR、従来の SDA（反応スキームは tSDA と本質的に同じであるが、中温酵素を使用して比較的低温で実施される）、3SR、NASBA および TAS などの他の核酸増幅プロトコールにも有用である。具体的には、標的配列へのプライマーの環状の特異的なハイブリダイゼーション、鋳型として標的配列を使用したプライマーの伸長および標的配列からの伸長産物の分離または置換を使用する任意の増幅プロトコールは、本発明の標的結合配列を使用することができる。特殊な非標的結合配列を必要としない増幅方法では（例えば、PCR）、増幅プライマーは表 1 に掲載する増幅プライ

マーの標的結合配列だけからなることができる。

【0029】選択した増幅反応を実施するのに必要な他の配列を、オリゴヌクレオチドの種特異性を変更することなく本明細書に開示されている標的結合配列に任意に添加してもよい。一例として、特異的な増幅プライマーは、SDA反応の間にニックを入れられる制限エンドヌクレアーゼBsoBIの認識部位を含有してもよい。欧州特許第0 684 315号に開示されている認識部位を含むがこれらに限定されない、ニックを入れることができる他の制限エンドヌクレアーゼ認識部位をBsoBI認識部位と交換することができることは当業者に明らかである。好ましくは、増幅反応がtSDA条件下で実施することができるように、認識部位は好熱性制限エンドヌクレアーゼ用である。同様に、増幅プライマーのテール配列（制限エンドヌクレアーゼ認識部位の5'側）は一般に重要ではないが、SDAに使用する制限部位およびそれら自体の標的結合配列または他のプライマーのどちらかにハイブリダイゼーションする配列は避けられるべきである。従って、SDAのためのいくつかの増幅プライマーは3'末端標的結合配列、標的結合配列のニックを入れることが可能な5'末端制限エンドヌクレアーゼ認識部位および制限エンドヌクレアーゼ認識部位の5'末端の鎖長約10~25ヌクレオチドのテール配列からなる。ニックを入れることが可能な制限エンドヌクレアーゼ認識部位およびテール配列は、SDA反応に必要な配列である。他の増幅反応では（例えば、3SR、NASBAおよびTAS）では、増幅プライマーは選択した増幅反応に必要な標的結合配列および追加の配列からなってもよい（例えば、上記のSDAに必要な配列または3SRのためのRNAポリメラーゼによって認識されるプロモーター）。本発明の標的結合配列をSDA以外の増幅方法に適合するには、選択した増幅反応のプライマーのための化学合成などの増幅プライマーを製造するための通常の方法および周知の構造上の要件を使用する。従って、本発明の標的結合配列は、製造、スクリーニングおよび最適化のための通常の方法だけを使用して種々の増幅反応における*C. ジェジュニ* (*C. jejuni*) と *C. コリ* (*C. coli*) に特異的標的増幅および検出に容易に適合することができる。

【0030】SDAでは、バンパープライマーは下流の種特異的増幅プライマーを置換する作用をするので、種特異性に必須ではない。バンパープライマーが伸長されたとき、それらは増幅プライマーおよびその伸長産物と置換するように、バンパープライマーは増幅プライマーの上流の標的にハイブリダイゼーションすることだけが要求される。従って、バンパープライマーの特定の配列は一般に重大ではなく、バンパープライマーの伸長の結果、増幅プライマー伸長産物の置換を可能にするために、増幅プライマーの結合部位に十分に近接した上流の任意の標的配列から誘導されてもよい。バンパープライマーが特異的標的配列とハイブリダイゼーションするこ

とができ続ける限り、バンパープライマー配列の標的との時折のミス対合または非標的配列との数カ所の交差ハイブリダイゼーションは一般に増幅効率に負の影響を与えない。

【0031】本発明のプライマーを使用した増幅反応は、ウォーカー (Walker) ら (1992、Nucl. Acids Res. 20: 1691-1696) によって教示されるようにチミンを導入することができ、または例えば欧州特許第0 624 643 に教示されているように、その後の増幅反応の交差汚染を低下するために、反応において2'-デオキシウリジン 5'-トリホスフェートとTTPとを全てもしくは一部交換することができる。dU (ウリジン) は増幅産物に導入され、ウラシルDNAグリコシラーゼ (UDG) で処理することによって切除することができる。これらの非塩基性部位はその後の増幅反応において増幅産物を増幅不可能にする。UDGは、新たに形成された増幅産物中のdUの切除を防止するために、その後の増幅を実施する前に、ウラシルDNAグリコシラーゼ阻害剤 (UGI) によって不活性化してもよい。

【0032】SDAは、プライマーの伸長、半改変制限エンドヌクレアーゼ認識/切断部位へのニックング、1本鎖伸長産物の置換、伸長産物（または元の標的配列）へのプライマーのアニーリングおよびプライマーのその後の伸長が反応混合物中で同時に生じる等温核酸増幅方法である。これは、反応ステップが反応の特徴である温度サイクルの結果として別個の相またはサイクルで生じるPCRと対照的である。SDAは、1) 2本鎖認識/切断部位のヘミホスホロチオエート形態の半改変鎖にニックを入れる制限エンドヌクレアーゼの能力および2) ニック部位で複製を開始し、下流の非鋳型鎖と置換するある種のポリメラーゼの能力に基づいている。プライマーをアニーリングするために2本鎖標的配列を変性した後、新たに合成された鎖のその後の重合および置換は一定の温度で生じる。標的配列の新たな各コピーの作製は以下の5つのステップからなる。1) 元の標的配列または以前に重合され置換された1本鎖伸長産物への増幅プライマーの結合、2)  $\alpha$ -チオデオキシヌクレオシドトリホスフェート ( $\alpha$ -チオ、dNTP) を導入する5'-3'エキソヌクレアーゼ欠損ポリメラーゼによるプライマーの伸長、3) 半改変2本鎖制限部位へのニックング、4) ニック部位からの制限酵素の解離および5) 5'-3'エキソヌクレアーゼ欠損ポリメラーゼによるニックングの3'末端からの伸長と新たに合成された下流の鎖の置換。ニックングからの伸長は、ニックを入れることが可能な別の制限部位を再生するので、ニックング、重合および置換は一定の温度において同時および連続的に生ずる。一対の増幅プライマーを使用する場合には、その各々は2本鎖標的配列の2本の鎖の一方にハイブリダイゼーションし、増幅は指数関数的である。これは、センス鎖およびアンチセンス鎖が、その後の増幅過程における対向プライマーの鋳型として

作用するからである。1つの増幅プライマーを使用する場合には、1本の鎖だけがプライマー伸長の鋳型として作用するので、増幅は線形である。 $\alpha$ -チオdNTPを導入する場合に、2本鎖認識/切断部位に入れ目を入れる制限エンドヌクレアーゼの例は、HincII、HindII、AvaI、NciIおよびFnu4HIである。これらの制限エンドヌクレアーゼの全ておよび必要なニックング活性を示す他の制限エンドヌクレアーゼは、従来のSDAに使用するのに好適である。しかし、それらは比較的熱感受性であり、約40℃より高い温度において失活する。

【0033】SDAによる増幅の標的は、標的配列を切断しないエンドヌクレアーゼによる制限によってより大きい核酸を断片化することによって作製することができる。しかし、Walkerら、(1992, Nucl. Acids Res. 20: 1691-1696)によっておよび米国特許第5,270,184号(参照として本明細書に組み入れられている)において記載されているように、SDA反応においてニックを入れるための選択された制限エンドヌクレアーゼ認識部位/切断部位を有する標的核酸を作製することが一般に好ましい。簡単に説明すると、標的配列が2本鎖である場合には4つのプライマーがそれにハイブリダイゼーションする。プライマーの2つ(S<sub>1</sub>およびS<sub>2</sub>)はSDA増幅プライマーであり、2つ(B<sub>1</sub>およびB<sub>2</sub>)は外部すなわちバンパープライマーである。S<sub>1</sub>およびS<sub>2</sub>は標的配列に隣接する2本鎖核酸の対向鎖に結合する。B<sub>1</sub>およびB<sub>2</sub>は、それぞれS<sub>1</sub>およびS<sub>2</sub>の5'側(すなわち、上流側)標的配列に結合する。次いで、3つのデオキシヌクレオシドトリホスフェートおよび少なくとも1つの改変デオキシヌクレオシドトリホスフェート(例えば、2'-デオキシアデノシン5'-0-(1-チオトリホスフェート)、「dATP $\alpha$ S」)の存在下においてエキソヌクレアーゼ欠損ポリメラーゼを使用して4つのプライマー全てを同時に伸長する。それによって、S<sub>1</sub>およびS<sub>2</sub>の伸長産物はB<sub>1</sub>およびB<sub>2</sub>の伸長によって元の標的配列鋳型から置換される。増幅プライマーの置換された1本鎖伸長産物は、対向側の増幅およびバンパープライマーの結合のための標的として作用する(例えば、S<sub>1</sub>の伸長産物はS<sub>2</sub>およびB<sub>2</sub>に結合する)。次の伸長および置換サイクルによって、2つの2本鎖核酸断片は各末端において制限エンドヌクレアーゼ認識/切断部位が半改変される。これらはSDAによる増幅のための好適な基質である。SDAと同様に、標的作製反応の個々のステップは同時および連続的に生じて、SDAにおいて制限酵素によってニックを入れるのに必要な認識/切断配列を末端に有する標的配列を作製する。SDA反応の成分の全てはすでに標的作製反応中に存在するので、自動的で、連続的に作製された標的配列がSDAサイクルに入り、増幅される。

【0034】別のものの増幅産物によるSDA反応の交差汚染を予防するために、増幅反応を阻害することなく、dTTPの代わりにdUTPをSDA増幅DNAに導入することができ

る。次いで、ウラシルDNAグリコシラーゼ(UDG)による処理によって、ウラシルが改変された核酸が特異的に認識され、不活性化され得る。従って、前の反応においてdUTPがSDA増幅DNAに導入されると、その後のいかなるSDA反応も2本鎖標的の増幅の前にUDGで処理され、前に増幅された反応のdUを含有するいかなるDNAも増幅不可能にされる。その後の反応で増幅される標的DNAはdUを含有せず、UDG処理によって影響されない。次いでUDGは標的の増幅の前にUGIでの処理によって阻害され得る。または、UDGは熱によって不活性化されてもよい。tSDAでは、より高温の反応温度( $\geq 50^\circ\text{C}$ )を同時に使用して、UDGを不活性化して、標的を増幅することができる。

【0035】SDAは、5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を欠損し、2本鎖核酸の1本の鎖のニック部位において重合を開始し、鋳型としてニックのついていない鎖を使用して新たな相補鎖を作製すると同時にニックの下流の鎖を置換するポリメラーゼを必要とする。ポリメラーゼはヌクレオチドを遊離の3'-OHに付加することによって伸長しなければならない。SDA反応を最適化するためには、増幅され得る標的配列の鎖長を最長にするためにポリメラーゼが高処理性であることも望ましい。高処理性ポリメラーゼは、伸長産物を解離し、合成を停止する前に、かなりの鎖長の新たな鎖を重合することができる。置換活性は増幅反応に必須である。その理由は、置換活性が別のコピーを合成するのに利用できる標的を作製し、指数関数的な増幅反応において第2の増幅プライマーがハイブリダイゼーションすることができる1本鎖伸長産物を作製するからである。制限酵素のニック活性もかなり重要である。その理由は、反応を持続し、その後の標的増幅過程を開始させるのはニックング作用だからである。

【0036】tSDAは、Walkerら、(1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA89:392-396および1992, Nucl. Acids Res. 20:1691-1696)によって記載されている従来のSDAのように、望ましい熱安定性ポリメラーゼおよび熱安定性制限エンドヌクレアーゼの置換によって本質的に実施される。当然のことであるが、反応温度は置換された酵素に好適な高温に調整され、HincII制限エンドヌクレアーゼ認識/切断部位は選択した熱安定性エンドヌクレアーゼの適当な制限エンドヌクレアーゼ認識/切断部位によって置換される。また、ウォーカー(Walker)らと同じく、変性温度において十分に安定であれば、担当者は最初の変性段階の前に反応混合物に酵素を加えることができる。tSDAに使用するのに好ましい制限エンドヌクレアーゼはBsrI、BstNI、BsmAI、BslIおよびBsoBI(ニューイングランドバイオラボズ(NewEngland BioLabs))およびBstOI(プロメガ(Promega))である。好ましい好熱性ポリメラーゼはBca(パンヴェラ(Panvera))およびBst(ニューイングランドバイオラボズ(NewEngland BioLabs))である。

【0037】均一リアルタイム蛍光tSDA(Homogenous r

real time fluorescent tSDA) は tSDA の改良型である。それは、蛍光の消光を標的依存的に低下するために、検出オリゴヌクレオチドを使用する。検出オリゴヌクレオチドは、標的が存在しない場合に蛍光の消光が生じるように結合したドナー/アクセプター染料対を含有する。標的の存在下において検出オリゴヌクレオチドの分子内塩基対を形成した二次構造のときほぐし(unfolding)、または線状化は染料間の距離を増し、蛍光を消光させない。塩基対を形成した二次構造のときほぐしは、一般に二次構造の配列と相補鎖との間の分子間塩基対形成に関係し、その結果二次構造は少なくとも部分的に破壊される。それは、十分な鎖長の相補鎖の存在下では、十分に線状化され得る。好ましい実施態様において、二次構造と相補鎖との間の分子間塩基対形成は制限エンドヌクレアーゼ認識部位(RERS)を2本鎖化し、制限エンドヌクレアーゼによって切断可能またはニックを入れることを可能にするように、RERSは2つの染料の間に存在する。制限エンドヌクレアーゼによる切断またはニッキングは別個の核酸断片上のドナーおよびアクセプター染料を分離し、さらに消光の低下に寄与する。どちらの実施態様においても、蛍光パラメーターの関連ある変化(例えば、ドナー蛍光強度の増加、アクセプター蛍光強度の低下またはときほぐし前後の蛍光比)を標的配列の存在を示すものとしてモニターする。ドナー蛍光強度の変化をモニターすることが好ましい。なぜなら、この変化はアクセプター蛍光強度の変化より一般に大きいからである。蛍光寿命の変化などの他の蛍光パラメーターをモニターしてもよい。

【0038】均一リアルタイム蛍光 tSDA の検出オリゴヌクレオチドは、標的配列(標的結合配列)にハイブリダイゼーションする1本鎖5'側または3'側部分、並びに標的結合配列に隣接する分子内塩基対形成した二次構造を含むオリゴヌクレオチドである。本発明の検出オリゴヌクレオチドは、二次構造が分子内塩基対形成した場合にドナーの蛍光が消光し、二次構造のときほぐしまたは線状化によって蛍光の消光が低下するように検出オリゴヌクレオチドに連結されたドナー/アクセプター染料対をさらに含む。オリゴヌクレオチドの切断は、DNA二重らせんの両鎖のホスホジエステル結合を切断すること、または1本鎖DNAのホスホジエステル結合を切断することによる。これは、DNA二重らせんの2本鎖の1本だけのホスホジエステル結合を切断することをいうニッキングとは異なる。

【0039】均一リアルタイム蛍光 tSDA のための本発明の検出オリゴヌクレオチドは、プライマーの伸長またはハイブリダイゼーションのために選択した条件下において分子内塩基対を形成した二次構造を形成する配列を含む。二次構造は、標的結合配列の少なくとも一部が1本鎖3'または5'側テールを形成するように、検出オリゴヌクレオチドの標的結合配列に隣接して位置づけられる。

本明細書において使用する「標的結合配列に隣接して」という用語は、標的結合配列の全てまたは一部が5'または3'側テールにおいて1本鎖のまま存在し、標的とのハイブリダイゼーションに利用可能であることを意味する。すなわち、二次構造は標的結合配列全体を含まない。標的結合配列の一部は二次構造の分子内塩基対形成に関与してもよく、二次構造の分子内塩基対形成に関与する第1の配列の全てもしくは一部を含んでもよく、二次構造の分子内塩基対形成に関与する第1の配列の全てもしくは一部を含んでもよいが、好ましくはその相補的配列に伸長しない。例えば、二次構造がステム-ループ構造(例えば、「ヘアピン」)であり、検出オリゴヌクレオチドの標的結合配列が1本鎖3'側テールとして存在する場合には、標的結合配列はステムの第1のアームの全てまたは一部を介しておよび任意にループの全てまたは一部を介して伸長することもできる。しかし、標的結合配列は、好ましくは、ステムの分子内塩基対形成に関与する配列の第2のアームには伸長しない。すなわち、標的にハイブリダイゼーションすることができる二次構造の分子内塩基対形成に関与する両配列を持たないようにすることが望ましい。検出オリゴヌクレオチドの二次構造の分子内塩基対形成部分のミス対合は、標的の存在下における蛍光の変化の大きさを低下することがあるが、アッセイ感度が懸念されない場合には許容される。1本鎖テールの標的結合配列のミス対合も許容されるが、同様にアッセイ感度および/または特異性を低下することがある。しかし、二次構造および標的結合配列の完璧な塩基対形成が反応を妨害しないことが本発明の特徴である。ハイブリダイゼーションに関与する配列の完璧な対合は、反応動態に負の影響を与えることなくアッセイの特異性を改善する。

【0040】増幅反応に添加する場合には、本発明の検出オリゴヌクレオチドシグナルプライマーは、上記のようにハイブリダイゼーションおよび伸長によって2本鎖形態に変換される。ポリメラーゼによる鎖置換も二次構造をときほぐすかまたは線状化し、相補鎖の合成によって2本鎖形態に変換する。存在する場合には、RERSも2本鎖になり、制限エンドヌクレアーゼによって切断可能またはニッキングされることが可能になる。二次構造はポリメラーゼの鎖置換活性によってときほぐされるかまたは線状化されるので、ドナーとアクセプター染料間の距離は増加し、それによってドナーの蛍光は消光しない。ドナーまたはアクセプター染料のどちらかの蛍光の関連する変化を標的配列の増幅を示すものとしてモニターまたは検出することができる。RERSの切断またはニッキングは一般に、2本鎖の二次増幅産物の2つの別個の断片を作製し、各々は2つの染料の一方が連結することによって蛍光の変化の大きさをさらに増す。これらの断片は反応溶液中を自由に拡散し、さらにドナー/アクセプター対の染料間の距離を増す。ドナー蛍光強度の増加または

アクセプター蛍光強度の低下は、標的増幅が生じているまたは生じたことを示すものとして検出および/またはモニターされ得るが、ドナー/アクセプター染料対の接近によって影響される他の蛍光パラメーターもモニターされることがある。ドナーまたはアクセプターの蛍光強度の変化はドナーおよび/またはアクセプターの蛍光強度の比の変化として検出されることもできる。例えば、蛍光強度の変化は、a) 二次構造を線状化またはときほぐした後のドナー蛍光団の蛍光と線状化またはときほぐしの前の検出オリゴヌクレオチドのドナーの蛍光団の蛍光の比の増加、またはb) 洗浄化またはときほぐし後のアクセプター染料の蛍光と線状化またはときほぐし前の検出オリゴヌクレオチドのアクセプター染料の蛍光の比の低下として検出することができる。

【0041】本発明の検出オリゴヌクレオチドは、SDA以外に、他のプライマー伸長増幅方法（例えば、PCR、3SR、TMAまたはNASBA）のシグナルプライマーとして使用するために適応することができることが明らかになる。例えば、本発明の方法は、PCRにおいてPCR増幅プライマーおよび5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠損する鎖置換DNAポリメラーゼ（例えば、プロメガ（Promega）社製のシーケンシンググレードTaqまたはニューイングランドバイオラボズ（New England BioLabs）社製のexo<sup>-</sup>Ventもしくはexo<sup>-</sup>Deep Vent）を使用することによってPCRにおいて使用するために適応することができる。検出オリゴヌクレオチドシグナルプライマーは、本質的にSDAについて記載されているように、PCR増幅プライマーの下流の標的にハイブリダイゼーションし、置換され、2本鎖化される。PCRでは、RERSの切断ではなくニックングを誘導すると思われる改変されたデオキシヌクレオシドトリホスフェートが一般に存在しないので、いかなるRERSも検出オリゴヌクレオチドに使用するために任意に選択することができる。温度サイクルはPCRによる増幅の特徴であるので、増幅の終点の検出には、制限エンドヌクレアーゼは、好ましくは、プライマーのアニーリングおよび伸長の最後のサイクルの後で低温において添加される。しかし、PCR反応の高温相を通して活性を維持している好熱性制限エンドヌクレアーゼは、増幅中存在すると思われる、リアルタイムアッセイとなる。SDAシステムと同様に、染料対の分離は蛍光の消光を低下し、強度などの蛍光パラメーターの変化は標的増幅を示すものとして作用する。

【0042】検出オリゴヌクレオチドのときほぐしまたは線状化による蛍光の変化は、反応の選択された終点において検出することができる。しかし、線状化された二次構造はハイブリダイゼーションまたはプライマーの伸長と同時に作製されるので、蛍光の変化は、反応が生じているとき、すなわち「リアルタイム」にモニターすることもできる。この均一なリアルタイムアッセイ形式は、存在する最初の標的量についての半定量または定量

情報を提供するために使用することができる。例えば、ときほぐしまたは線状化反応中に蛍光強度が変化する速度（標的増幅の一部としてまたは非増幅検出方法において）は、最初の標的量を示すものである。結果として、標的配列は最初のコピー量が多いほど、ドナー蛍光は選択した閾値により迅速に到達する（すなわち、正になるまでの時間がより短い）。選択した最小値に到達するのに必要な時間として検出するとき、アクセプター蛍光の低下は、同様に正になるまでの時間の短いことを示す。また、反応経過中の蛍光パラメーターの変化速度は、最初の標的量がより少ない試料と比較して最初の標的量がより多い試料においてより迅速である（すなわち、蛍光曲線の傾斜が大きい）。標的の存在を示すものとして、または標的増幅を示すものとしてこれらの測定または当技術上周知である他の測定を実施することができる。最初の標的量は、一般に、実験結果を既知量の標的の結果と比較することによって求められる。

【0043】本発明の方法による選択した標的配列の存在に関するアッセイは、溶液中または固相において実施することができる。検出オリゴヌクレオチドがプライマーとして作用する実時間または終点均一アッセイは、一般に、溶液中で実施される。本発明の検出オリゴヌクレオチドを使用したハイブリダイゼーションアッセイも溶液中で実施することができる（例えば、均一リアルタイムアッセイ）、標的の実時間検出または終点検出の固相アッセイに、特に好適である。固相アッセイでは、検出オリゴヌクレオチドは、当技術上周知な方法を使用して、内部または末端標識を介して固相（例えば、ビーズ、膜または反応容器）に固定することができる。例えば、ビオチンを標識した検出オリゴヌクレオチドは、アビジンを修飾した固相に固定化することができ、そこで、適当なハイブリダイゼーション条件下において標的に暴露されると、蛍光の変化を生ずる。この様式での標的の捕獲は試料から標的の分離を容易にし、シグナルの検出またはアッセイの他の局面を妨害することがある試料中の基質の除去を可能にする。使用することができる固相系の一例はエレクトロニックマイクロアレイ、すなわち活発なプログラミング可能なエレクトロニックマトリックスハイブリダイゼーションシステムである。

【0044】本発明に使用するための活発なプログラミング可能なエレクトロニックマトリックスハイブリダイゼーションシステムの単純化した形態は以下に記載されている。一般に、基材は電子的に位置指定可能な微細位置のマトリックスまたはアレイを支持する。個々の電極の上部に透過層が配置される。透過層は比較的小さい荷電物質の輸送を可能にするが、DNAなどの大きい荷電物質が電極に直接接触しないようにする。透過層は、電極に直接接触することによってDNAに生ずるとと思われる電気化学的分解を生じないようにする。透過層は、さらに、電極へのDNAの強力な非特異的吸着をさせないよう

に作用する。結合領域は透過層の上に配置され、標的物質の特異的結合部位となる。

【0045】操作時には、検出、分析または使用するための望ましい（および望ましくない）材料を含有するリサーバーは、結合領域の上部に空間を有する。荷電したDNAなどの荷電物質はリサーバーの中に配置される。一局面において、活発なプログラミング可能なマトリックスシステムは、荷電物質を特異的な微細位置のいずれにも輸送するための方法を含む。活性化すると、微細位置は荷電し、官能基を導入され特異的に結合したいかなる物質も電極方向へ自由電界電気泳動的に輸送する。例えば、一方の電極を正にし、もう一方の電極を負にすると、電気泳動的な力線が2つの電極間に働くと思われる。電気泳動的な力によって、正味負電荷を有する荷電結合物質は正の電極方向に輸送される。正味正電荷を有する荷電物質は電気泳動力で負に荷電した電極方向に移動する。官能基が導入されている正味負に荷電した結合物質は電気泳動力でその移動の結果として結合層に接触すると、官能基を導入された特異的結合物質は第1の電極に相当する結合層に共有結合する。

【0046】電気泳動的な輸送は、一般に、系内で電気分解およびイオンの輸送を可能にするのに十分な電圧を適用することにより生ずる。電解質溶液を介するイオンの輸送によるなどの、電気泳動的移動が生じ、系に電流が流れる。この方法では、完全な回路はイオン電流を介して形成され、回路の残りは電極および制御式電気回路などの従来のエレクトロニック構成要素によって完成される。例えば、塩化ナトリウム、リン酸ナトリウム、緩衝液およびイオン種などの従来の材料を含有する電解質水溶液では、電気分解およびイオンの輸送を誘導する電圧はほぼ1.2ボルトより大きい、または等しい。

【0047】対応する電極を負にすることによって反応を起こさない結合層を保護することが可能である。これによって、電気泳動的な力線がこのような結合領域から発する。電気泳動的な力線は、負に荷電した結合物質を未反応結合層から第1の電極に相当する結合層方向に駆動する作用をする。この方法では、そのときに荷電分子と非反応性であることが望ましい「力場」保護が結合層の周囲に形成される。

【0048】この系の1つのかなり有利な結果は、荷電した結合物質はシグナル結合層に隣接する領域に高度に濃縮され得るということである。例えば、個々の微細位置が正に荷電され、残りの微細位置が負に荷電されると、電気泳動的な力線は正味負に荷電した結合物質を正に荷電した微細位置方向へ輸送する。この方法では、装置上のいかなる特異的な微細位置においても分析物質または反応物質を濃縮し、反応させるための方法を実施することができる。特異的な結合物質を結合層に結合した後、下層の微細電極は直流（DC）モードで機能し続けることができる。この独自の特徴によって、溶液中で自由

で比較的希薄な荷電した分析物質または反応物質は、分析物質または反応物質の分子と反対の電荷を維持しているいかなる特異的な微細位置においても連続的または平行的に迅速に輸送、濃縮および反応することができる。選択した微細位置における希薄な分析物質または反応物質分子を濃縮するような能力はこれらの微細位置における反応速度を大幅に加速する。

【0049】望ましい反応が終了したら、電極はその電位を逆転させることができ、それによって前の引力と反対の方向に電気泳動力を生じる。この方法では、非特異的分析物質または未反応分子が微細位置から移動され得る。特異的な分析物質または反応産物はいかなる微細位置からも放出され、さらに分析するために他の位置に輸送され、他の位置指定可能位置で保存されるかまたは系から完全に除去される。電場の逆転によるこのような材料の除去または分解は、非特異的結合物質を除去することによって、系の識別能力を向上させる。現在反発的な電気泳動力の量を結合層の非特異的結合材料に制御することによって、電子的な緊縮の制御を達成することができる。部分的にハイブリダイゼーションしたDNA配列を除去するのに十分な電場を形成するために、電極の電位を上昇して、それによって1つのミス対合したハイブリダイゼーションの識別を可能にすることによって、点突然変位を識別することができる。

【0050】操作は種々の結合層において平行して、または連続して実施することができる。例えば、反応は、最初は、示した電位を使用して第1の結合層で生じることができる。第1の電極の電位を逆転、すなわち負にすることができ、隣接する第2の電極を正にすることができる。この方法では一連の反応が生ずる。第1の結合層に特異的に結合しない材料は結合層への電気泳動力によって輸送されると思われる。この方法では、濃縮局面を使用して、特異的な結合層において高濃度とし、次いで正の電気泳動力に晒す。次に、濃縮された物質は隣接する、または他の結合層に移動することができる。または、電極から発し、結合層を通過してリサーバーに入る正味電気泳動力場が存在するという意味では、多数の結合層を脱保護することができる。多数の結合層を脱保護することによって、多数の反応が実施される。所定の結合層によって位置指定される特定の環境が他の結合層を取り巻く環境とは異なることがあるという点では、個々の部位は各々、本質的に別個の生物学的な「試験管」として作用することができる。

【0051】一実施態様において、透過層はアビジンを含有し、SDAプライマーの一方はビオチンを含有する。増幅の後に、アンプリコンはアレイ上で電子的に位置指定され、アビジンに結合する。次いで、標識した1つ以上の検出プローブを添加し、アンプリコンとハイブリダイゼーションさせる。次いで、ハイブリダイゼーションした検出プライマーの存在を検出する。第2の実施態様

において、1つ以上の捕獲プローブは増幅された拡散とハイブリダイゼーションするように設計される。各捕獲プローブはビオチンを含み、結合されるかまたは電子的に位置指定され、透過層がアビジンを含み、アレイに結合される。次いで、アンプリコンはアレイ上で電子的に位置指定され、捕獲プローブとハイブリダイゼーションする。次いで、標識した1つ以上の検出プライマーを添加して、アンプリコンとハイブリダイゼーションさせる。次いで、ハイブリダイゼーションした検出プローブの存在を検出する。

【0052】エレクトロニックマイクロアレイおよび関連するシステムのさらなる詳細は、その開示内容が参照として特に本明細書に組み入れられている、Hellerら（1997、米国特許第5,605,662号；1997、米国特許第5,682,957号；1997、PCT出願国際公開公報第97/12030号）およびSosnowskiら（1998、PCT出願国際公開公報第98/10273号）によって記載されている。

【0053】また、いくつかのアッセイ形式を含む、SDAおよびエレクトロニックマイクロアレイを使用する方法は、参照することにより本明細書に組み入れられている本明細書と同時提出された、同時係属中の出願番号第09/\_\_\_\_（事務所整理番号第235/139号）に開示されている。この出願に記載されている一実施態様では、1本鎖捕獲プローブがアレイに電子的に沈着され、標的核酸またはアンプリコンなどの1本鎖の荷電分子を捕獲する作用をするサンドイッチアッセイが使用されている。核酸捕獲プローブなどの多様な分子が異なるパッドのアレイに電子的に沈着されてもよい。標的分子またはアンプリコンと捕獲プローブのハイブリダイゼーションは、電子的に実施されることが好ましい。捕獲部位に荷電分子が捕獲されると、捕獲された分子は、捕獲された分子に結合する標識されたレポータープローブによって検出することができる。

【0054】この出願に記載されている第2の実施態様では、電子的な増幅がマイクロアレイ上で実施される。この実施態様では、標的核酸は、捕獲部位に配置された固定プライマーに近接して電子的に濃縮され、SDAまたは他の増幅方法に使用される。電子的ハイブリダイゼーションを使用して、鋳型分子を固定されたSDAプライマーにハイブリダイゼーションする。次いで、マイクロチップを、鋳型および増幅プライマー以外のSDA成分を含むSDA反応混合物と共にインキュベーションする。反応を停止した後、産物を変性し、標的核酸の存在を検出するためにマイクロチップをレポータープローブとインキュベーションする。これらの実施態様は、(a) 増幅がエレクトロニックマイクロアレイ上で実施されてから分析できる、または (b) 増幅は溶液中で実施され、次いで分析がエレクトロニックマイクロアレイ上で実施できることを例示している。

【0055】実施例

以下の実施例は本明細書に記載する本発明の具体的な実施態様を例示している。当業者に明らかであるように、種々の変更および修正が可能であり、記載されている本発明の範囲内であると考えられる。

【0056】例1

#### プライマースクリーニング

表1に示す上流および下流増幅プライマーの対応による全ての組み合わせを標的の増幅について試験した。増幅反応は、*C. jejuni* (*C. jejuni*) 標的DNAの10<sup>6</sup>ゲノム当量の存在下において実施した。増幅反応は、以下の最終濃度の成分を含む緩衝液中で52°Cにおいて実施した。30~40 mMリン酸カリウム (pH 7.6)、5~9 %グリセロール、3~7%ジメチルスルホキシド (DMSO)、5 mM酢酸マグネシウム、700 ngのヒト胎盤DNA、10 μgの酢酸化ウシ血清アルブミン、1.82%のトレハロース、0.36 mMのジチオスレイトール、500 nMのtSDAプライマー、50 nMのSDAバンパープライマー、0.25 mMのdUTP、0.7 mMの2'-デオキシシチジン 5'-0- (1-チオトリホスフェート)、0.1 mMのdATP、0.1 mMのdGTPおよび約640単位のBsoBIおよび40単位のBstポリメラーゼ。

【0057】簡単に説明すると、95°Cにおいて5分間標的DNAを変性し、室温に冷却してから、プライマーおよびバンパーを含む緩衝液に添加する。インキュベーションは室温において20分間持続し、次に偽プライミングの可能性を最小にするために、インキュベーションを70°Cにおいて10分間実施した。次いで、増幅酵素を含むマイクロタイターウェルに一定容量のプライミング混合物を移すことによって52°Cにおいて増幅を開始した。増幅は52°Cの一定温度において1時間実施した。P32標識検出配列である配列番号10を用いてプライマーを伸長し、8%変性性ポリアクリルアミドゲル中に溶解してから、オートラジオグラフィーによって増幅産物を検出した。試験した9つのプライマー組み合わせ全てで特異的な増幅産物が検出された。

【0058】例2

#### 分析感度の判定

上記の例1に記載するように、増幅プライマー配列番号1と配列番号4、配列番号1と配列番号5および配列番号2と配列番号5を用いてSDAを実施した。反応あたり0、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>または10<sup>5</sup>ゲノム当量の標的DNAを加えた。10<sup>2</sup>標的の分析感度が得られた。

【0059】例3

#### プライマー特異性の評価

例1に記載する配列番号1、配列番号5、配列番号7および配列番号8を使用し、30 mMリン酸カリウム、9%グリセロールおよび3% DMSOを用いてプライマーの特異性を評価した。34株の*C. jejuni* (*C. jejuni*) および*C. coli* (*C. coli*) を反応あたり10<sup>5</sup>ゲノム当量で試験した (表2)。34株全てが算出した特異性100%に対して正の結果を示した。



【0060】

【表2】

*Campylobacter*の特異性パネル

種	株
<i>C. jejuni</i>	ATCC 33291
<i>C. jejuni</i>	ATCC 33292
<i>C. jejuni</i>	ATCC 49349
<i>C. jejuni</i>	ATCC 29428
<i>C. jejuni</i>	ATCC 33560
<i>C. jejuni</i>	ATCC 49943
<i>C. jejuni</i>	T-401
<i>C. jejuni</i>	T-402
<i>C. jejuni</i>	T-403
<i>C. jejuni</i>	T-404
<i>C. jejuni</i>	T-405
<i>C. jejuni</i>	T-407
<i>C. jejuni</i>	T-408
<i>C. jejuni</i>	T-410
<i>C. jejuni</i>	T-411
<i>C. jejuni</i>	T-413
<i>C. coli</i>	ATCC 43474
<i>C. coli</i>	ATCC 33559
<i>C. coli</i>	ATCC 49941
<i>C. coli</i>	ATCC 43472
<i>C. coli</i>	ATCC 43473
<i>C. coli</i>	ATCC 43475
<i>C. coli</i>	ATCC 43476
<i>C. coli</i>	ATCC 43477
<i>C. coli</i>	ATCC 43479
<i>C. coli</i>	ATCC 43481
<i>C. coli</i>	ATCC 43482
<i>C. coli</i>	ATCC 43483
<i>C. coli</i>	ATCC 43484
<i>C. coli</i>	ATCC 43486
<i>C. coli</i>	ATCC 43489
<i>C. coli</i>	ATCC 43499
<i>C. coli</i>	T-449
<i>C. coli</i>	T-834

【0061】例4

## 交差反応の評価

例3に記載するプライマーおよび反応条件を使用して交差反応を評価した。*C. ジェジュニ* (*C. jejuni*) および *C. コリ* (*C. coli*) 以外の生物は、反応あたり $10^7$ ゲノム当量で試験した。試験した20種の生物全てで陰性の結果が得られた(表3)。全ての場合において、 $10^4$ コピーの *C. ジェジュニ* (*C. jejuni*) 標的DNAを反応物中に接種すると、特異的な産物が得られた。これは増幅阻害がないことを示す。

【0062】

【表3】

*Campylobacter* の交差反応パネル

種		株
<i>Actinomyces israelii</i>	血清型 1	ATCC 10049
<i>Arcobacter butzleri</i>		ATCC 49616
<i>Bacteroides ureolyticus</i>		ATCC 33387
<i>Campylobacter lari</i>		ATCC 43675
<i>Candida albicans</i>		ATCC 44808
<i>Citrobacter freundii</i>		ATCC 8090
<i>Enterobacter cloacae</i>		ATCC 13047
<i>Enterococcus faecalis</i>		ATCC 29212
<i>Escherichia coli</i>		T-4025
<i>Escherichia</i>		T-3785
<i>Helicobacter pylori</i>		ATCC 43526
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		ATCC 13883
<i>Proteus mirabilis</i>		ATCC 29906
<i>Salmonella typhimurium</i>		ATCC 13311
<i>Shigella sonnei</i>		ATCC 29029
<i>Staphylococcus aureus</i>	subsp. <i>aureus</i>	ATCC 12598
<i>Streptococcus bovis</i>		ATCC 9809
<i>Streptococcus pyogenes</i>	グループ A	ATCC 19615
<i>Vibrio cholerae</i>		ATCC 14035
<i>Yersinia enterocolitica</i>		ATCC 9610

## 【0063】例5

## エレクトリックマイクロアレイ分析

マイクロエレクトリックアレイ集成物は以前に記載されている。R. G. Sosnowskiら、1997、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 119-123) 捕獲プローブ、アンプリコンまたは検出プローブの電子標的化は別の文献に報告されている条件を使用した (R. G. Sosnowskiら、1997、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 119-123; C. F. Edmanら、1997、Nucl. Acids Res. 25: 4907-4914)。マイクロエレクトロニックアレイ集成物の透過層は、有利なことに、アビジンを含有する。簡単に説明すると、捕獲プローブはマイクロエレクトロニックアレイ上で電子的に位置指定される。粗増幅反応物は蒸留水で予め平衡にしたG6カラム (バイオラッド (Biorad)、カリフォルニア州ヘルクルス) で2分間スピン (spin) させるか、また

はマルチウェルプレート (ミリポア (Millipore)、マサチューセッツ州ベッドフォード) で蒸留水に対して5時間以上透析する。次いで、調製した試料を100 mMヒスチジンと1:1の比で混合し、95°Cにおいて5分間加熱してから、電子的に位置指定する。検出のために、蛍光標識オリゴヌクレオチド (検出プローブ) を6×SSCに添加し、室温で30分間ハイブリダイゼーションさせる。次いで、アレイを0.1×STE/1%SDSで洗浄し、次に1×STEで洗浄する。次いで、検出プローブの存在を検出する。

【0064】本発明はいくつかの具体例を用いて記載されているが、当業者に明らかな修正を本発明の範囲から逸脱することなく実施することができる。本発明の種々の特徴は以下の請求の範囲に記載されている。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

- <:110>: McMillian, Ray A.  
Fort, Thomas L.  
Hellyer, Tobin J.  
You, Qimin
- <:120>: Amplification and Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.
- <:130>: *C. jejuni* and *C. coli* Application
- <:140>: JP P2000-110098
- <:141>: J2000-04-12
- <:150>: US 09/289,747
- <:151>: 1999-04-12
- <:160>: 10

<:170>: PatentIn Ver. 2.0  
 <:210>: 1  
 <:211>: 40  
 <:212>: DNA  
 <:213>: Artificial Sequence  
 <:220>:  
 <:223>: Description of Artificial Sequence:Primer for SDA  
           of C. jejuni and C. coli  
 <:400>: 1  
 cgattccgct ccagacttct cgggcaggat ggttttggtt 40  
 <:210>: 2  
 <:211>: 39  
 <:212>: DNA  
 <:213>: Artificial Sequence  
 <:220>:  
 <:223>: Description of Artificial Sequence:Primer for SDA  
           of C. jejuni and C. coli  
 <:400>: 2  
 cgattccgct ccagacttct cgggcaggat ggttttggtt 39  
 <:210>: 3  
 <:211>: 38  
 <:212>: DNA  
 <:213>: Artificial Sequence  
 <:220>:  
 <:223>: Description of Artificial Sequence:Primer for SDA  
           of C. jejuni and C. coli  
 <:400>: 3  
 cgattccgct ccagacttct cgggcaggat ggttttgg 38  
 <:210>: 4  
 <:211>: 42  
 <:212>: DNA  
 <:213>: Artificial Sequence  
 <:220>:  
 <:223>: Description of Artificial Sequence:Primer for SDA  
           of C. jejuni and C. coli  
 <:400>: 4  
 accgcatcga atgcatgtct cgggaagta cctacaaatt ct 42  
 <:210>: 5  
 <:211>: 41  
 <:212>: DNA  
 <:213>: Artificial Sequence  
 <:220>:  
 <:223>: Description of Artificial Sequence:Primer for SDA  
           of C. jejuni and C. coli  
 <:400>: 5  
 accgcatcga atgcatgtct cgggaagtac ctacaaattc t 41  
 <:210>: 6  
 <:211>: 40  
 <:212>: DNA  
 <:213>: Artificial Sequence

<:220>:  
 <:223>: Description of Artificial Sequence:Primer for SDA  
           of C. jejuni and C. coli  
 <:400>: 6  
 accgcatcga atgcatgtct cgggagtacc tacaaattct 40  
 <:210>: 7  
 <:211>: 16  
 <:212>: DNA  
 <:213>: Artificial Sequence  
 <:220>:  
 <:223>: Description of Artificial Sequence:Bumper for SDA  
           for C. jejuni and C. coli  
  
 <:400>: 7  
 acaggagttt ttggtt 16  
 <:210>: 8  
 <:211>: 15  
 <:212>: DNA  
 <:213>: Artificial Sequence  
 <:220>:  
 <:223>: Description of Artificial Sequence:Bumper for SDA  
           for C. jejuni and C. coli  
 <:400>: 8  
 aataggtgta gctgc 15  
 <:210>: 9  
 <:211>: 17  
 <:212>: DNA  
 <:213>: Artificial Sequence  
 <:220>:  
 <:223>: Description of Artificial Sequence:Detector Probe  
           for SDA for C. jejuni and C. coli  
 <:400>: 9  
 ggtagttta taatact 17  
 <:210>: 10  
 <:211>: 19  
 <:212>: DNA  
 <:213>: Artificial Sequence  
 <:220>:  
 <:223>: Description of Artificial Sequence:Detector Probe  
           for SDA for C. jejuni and C. coli  
 <:400>: 10  
 ctagtttttg atttttagt 19

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

テマコード (参考)

(71) 出願人 595117091

1 BECTON DRIVE, FRA  
NKLIN LAKES, NEW JE  
RSEY 07417-1880, UNITED  
STATES OF AMERICA

(72) 発明者 トーマス・エル・フォート

アメリカ合衆国メリーランド州21048, フ  
ィンクスバーグ, リッジ・ロード 987

(72) 発明者 キミン・ユー

アメリカ合衆国メリーランド州21093, ル  
ーサーヴィル, キャヴァン・ドライブ 15